

Anwendung von chemisch modifizierter Messenger  
RNA als mögliches neues Therapeutikum bei  
Sehnenerkrankungen

von Maria Paola Karoline Groth

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Anwendung von chemisch modifizierter Messenger  
RNA als mögliches neues Therapeutikum bei  
Sehnenerkrankungen

von Maria Paola Karoline Groth

aus Heidelberg

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt am Institut für Experimentelle Onkologie und  
Therapieforschung der Technischen Universität München

Mentor: Prof. Dr. Christian Plank

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Tag der Promotion:** 18. Juli 2015

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>8</b>
1. Transfektion, Kultivierung und Biolumineszenzmessung <i>ex vivo</i> .....	8
2. Histologie von kultivierten Sehnen .....	10
3. <i>In vivo</i> Applikation von cmRNA in intakte und chirurgisch durchtrennte Achillessehnen im Rattenmodell .....	11
4. Sehnendefektetablierung <i>ex vivo</i> und nachfolgende Transfektion .....	14
5. Sehnendefektmodell und <i>in vivo</i> Proteinexpression im Schaf .....	15
6. Statistische Auswertung .....	18
<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>19</b>
1. Injektion von cmRNA resultiert <i>ex vivo</i> in hoher Proteinexpression .....	19
2. Glukose verbessert, Aminosäuren verschlechtern die Luciferaseexpression .....	22
3. Nackte cmRNA führt <i>in vivo</i> in intakten Sehnen zu dosisabhängiger Expression .....	25
4. Positiver Einfluss nackter cmRNA <sup>BMP-7</sup> auf frühe Heilungsphase in durchtrennten Achillessehnen im Rattenmodell .....	25
5. Die Injektion von Kollagenase-Gel lässt <i>ex vivo</i> Läsionen mit aufgelockerter Struktur entstehen .....	28
6. <i>In vivo</i> Injektion nackter cmRNA in geschädigte und intakte Sehnen von Schafen resultiert in ausgeprägter Proteinexpression .....	30
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>35</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>43</b>
<b>VI. SUMMARY .....</b>	<b>44</b>
<b>VII. LITERATUR .....</b>	<b>45</b>
<b>VIII. ANHANG .....</b>	<b>51</b>
<b>IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>X. DANKSAGUNG .....</b>	<b>55</b>

## I. EINLEITUNG

Verletzungen im Bereich von Sehnen und Bändern stellen häufige orthopädische Probleme für Tiere und Menschen dar, ganz besonders für Sportler [1]. Interessanterweise sind einige Sehnen speziesabhängig häufiger betroffen als andere. So werden Tendinopathien der Achillessehne sowie der Rotatorenmanschette beispielsweise häufig beim Menschen diagnostiziert [2-6]. Die Inzidenz von Achillessehnenverletzungen sollen in den letzten 20 bis 30 Jahren deutlich angestiegen sein. Lantto *et al.* berichten von einem vermehrten Auftreten von Achillessehnenrupturen in Finnland: 1979 lag die Anzahl der Neuerkrankungen bei 2,1/100.000 Einwohner und stieg auf 21,5/100.000 Einwohner im Jahre 2011 an [7]. Des Weiteren wurde 2009 in der niederländischen erwachsenen Bevölkerung eine Inzidenz von 2,35/1.000 erhoben, in welcher Patienten an Tendinopathien im mittleren Bereich der Achillessehne erkrankten [4].

Typische Verletzungen im Bereich der Sehnen und Bänder bei Tieren können beispielsweise bei Sportpferden häufig vorkommende Entzündungen der oberflächlichen oder tiefen Beugesehnen sein [8-11]. In der japanischen Rennpferdepopulation soll für Pferde mit Entzündungen der oberflächlichen Beugesehne der Vorhand 1999 eine Prävalenz von 11% vorgeherrscht haben [9]. Die Untersuchung von Pinchbeck *et al.* über die Häufigkeit von Sehnenverletzungen im Rennsport ergab ein Vorkommen von 6,9 Verletzungen/1.000 Starts in Großbritannien im Jahre 2004 [10]. Ely *et al.* hingegen berichten in einer aktuelleren Studie von einer deutlich höheren Inzidenz von 16,1 Verletzungen/1.000 Starts im Jahre 2009. Die Pferde zogen sich die Verletzungen dabei deutlich häufiger während des Rennens (42,5/100 Pferde je Monat) als im Training zu (1,9/100 Pferde je Monat) [12]. Sehnen- und Bänderverletzungen werden als einer der häufigsten Gründe für das Ausscheiden von Pferden aus dem Sport angesehen [13-15]. Beim Hund werden dagegen oftmals Kreuzbandrupturen diagnostiziert, wobei in den meisten Fällen das kraniale Kreuzband betroffen ist [16].

Die Ausprägung und Erscheinung von Sehnenschädigungen können sehr unterschiedlich sein: Sie reichen von akuten Rupturen bis zu chronischen Tendinopathien [2]. Die Ursachen sind vielfältig, und die prädisponierenden Faktoren sind für Menschen wie Tiere ähnlich. Risikofaktoren werden in extrinsische und intrinsische Faktoren unterteilt. Extrinsische Risikofaktoren werden in der Regel mit körperlicher Aktivität in Verbindung gebracht. Dabei kann es sich beispielsweise um maximale, die Zugbelastbarkeit der Sehne überschreitende Belastungen handeln, oder aber um eine wiederholte Überbelastung durch Training mit sehr hoher Intensität oder fehlerhafter Ausführung [17]. Es wird vermutet, dass der individuelle Trainingszustand dabei eine wichtige Rolle spielt, weil ermüdete Muskeln weniger Energie absorbieren können und eine übermäßige Zugbelastung daher schlechter abgefangen wird [17]. Überbelastungen von Bändern und Sehnen können außerdem durch anatomische Stellungsanomalien bedingt sein, weil durch Achsenabweichungen vermehrte und schräge Zugbelastungen auf Sehnen und Bänder ausgeübt werden können [18, 19]. Des Weiteren werden Umgebungsfaktoren wie die Bodenbeschaffenheit des Geläufs, aber auch Art und Qualität des Beschlags bei Pferden sowie des Schuhwerks bei Menschen als ausschlaggebende äußere Elemente angesehen. Es wird außerdem angenommen, dass die Anwendung von Kortikosteroiden oder Fluorchinolonen (besonders Ciprofloxacin) zu Strukturveränderungen im Sehnengewebe und zu einer Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften führen kann [20-22].

Im Gegensatz zu den äußeren Einflussfaktoren werden Alter, Geschlecht, Gewicht, Genetik oder auch verschiedene endokrinologische Vorerkrankungen als intrinsische Komponenten angesehen [2, 23-26]. Es konnte bereits bei Pferden sowie bei Menschen gezeigt werden, dass das Risiko einer Verletzung im Bereich der Sehnen mit zunehmendem Alter und Körpergewicht ansteigt [9, 27-29]. Außerdem sollen männliche Individuen häufiger betroffen sein [1, 9, 28, 30]. Rupturen des kranialen Kreuzbandes beim Hund sollen vermehrt bei

bestimmten Hunderassen auftreten, weswegen möglicherweise von einem genetischen Ursprung auszugehen ist [31].

Während extrinsische Faktoren bei akuten Verletzungen den größeren Einfluss haben sollen, könnte der Einfluss der intrinsischen Faktoren bei chronischen Prozessen überwiegen [32]. Wahrscheinlich ist jedoch, dass in den meisten Fällen beide Mechanismen beteiligt sind [33]. Häufig führt eine vorherige, möglicherweise auch chronische Schädigung durch Überbelastung oder degenerative Prozesse zu einer akuten Verletzung oder sogar zur Ruptur von Sehnen oder Bändern [34]. Die Entstehung sowie die möglichen Ursachen von degenerativen Prozessen sind bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt. Neben dem Einfluss von inflammatorisch wirkenden Mediatoren [35] wurde auch ein verändertes Expressionsmuster von kollagenabbauenden Enzymen, den sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMP), als möglicher Pathomechanismus diskutiert [36, 37]. Eine andere Erklärung könnte eine Überhitzung im zentralen Bereich der Sehne sein. Es wurde bereits von Temperaturanstiegen auf bis zu 45°C im zentralen Bereich der tiefen Beugesehne bei Pferden während der Galopparbeit berichtet [38]. Man nimmt an, dass wiederholt auftretende lokale Hyperthermie im Bereich der Sehnen möglicherweise zu einem veränderten Zellmetabolismus führt und so auch die Synthese und Organisation von Matrixkomponenten beeinflusst werden könnte [39]. Eine gute Durchblutung soll üblicherweise einer Überhitzung entgegenwirken. Da Sehnen jedoch eine relativ schlechte Gefäßversorgung besitzen, könnte dies möglicherweise eine Schlüsselrolle spielen [38]. Bei hoher Zugbelastung soll es in einigen Bereichen der Sehne durch die schlechte Vaskularisierung zu hypoxischen Zuständen kommen, so dass bei nachfolgender Reperfusion oxidativer Stress durch Bildung freier Sauerstoffradikale entstehen kann [40]. Neben degenerativ wirkenden Prozessen wird auch ein fehlgeschlagener Heilungsversuch nach Verletzung als mögliche Pathogenese von Tendinopathien diskutiert



[41, 42]. Vermutlich handelt es sich bei der Entstehung von Tendinopathien um ein hochkomplexes Geschehen, bei welchem verschiedenste Faktoren Einfluss nehmen.

Das natürliche Heilungspotenzial von Sehnengewebe ist durch geringe Zelldichte, dürftige Vaskularisation und niedrige metabolische Aktivität, verglichen mit anderen Binde- und Stützgeweben, eher gering [32, 43-45]. Der Sauerstoffverbrauch in Sehnen ist beispielsweise 7,5-fach geringer als in Skelettmuskeln [46]. Der Heilungsprozess erfolgt daher sehr langsam [2, 33, 43]; gewöhnlich dauert er Monate oder, je nach Ausmaß, sogar Jahre.

Die Heilung von Sehnengewebe ähnelt der Wundheilung in anderen Geweben [47] und kann in verschiedene aufeinanderfolgende, aber auch ineinander übergehende Phasen eingeteilt werden [48]. Während eines akuten Traumas kommt es gewöhnlich zur Schädigung oder Zerreißung von Sehnenfasern und Blutgefäßen, so dass zunächst ein Hämatom entsteht. Die am Hämatom beteiligten Thrombozyten setzen dann verschiedene vasoaktive und chemotaktisch wirkende Zytokine (u.a. verschiedene Wachstumsfaktoren) frei (hämorrhagische Phase). Durch chemotaktische Reize angelockt wandern Leukozyten, im Speziellen Makrophagen und neutrophile Granulozyten, in das verletzte Areal ein und beginnen tote Zellen und nekrotisches Material durch Phagozytose abzuräumen. Außerdem setzen sie eine weitere Mischung von Zytokinen frei. Angiogenese fördernde Faktoren stimulieren dabei die Gefäßneubildung bzw. Einsprossung von Gefäßen in das Wundareal (inflammatorische Phase). Es folgt die Invasion und Proliferation von Fibroblasten, welche entweder aus dem Endo- und Epitenon (intrinsische Zellen) oder aber aus der Sehnenscheide, umgebenden Faszien oder subkutanem Gewebe (extrinsische Zellen) einwandern [33, 49]. Es wird vermutet, dass gewöhnlich beide Fraktionen beteiligt sind, welche jedoch überwiegt, soll von Ausmaß und Lokalisation der Verletzung abhängig sein [33, 50]. Des Weiteren wird die Synthese von Extrazellulärsubstanz stimuliert, wobei vermehrt Kollagen Typ III gebildet wird (proliferative Phase) [51]. Diese Vorgänge lassen Granulationsgewebe entstehen, welches in

der letzten Phase weiteren Umbauvorgängen unterzogen wird (remodeling phase). Die Kollagensynthese wird von Typ III auf Typ I umgestellt, Sehnenfasern richten sich vermehrt entlang der Sehnenlängsachse aus und werden quervernetzt, schließlich bekommen Tenoblasten eine länglichere Form und differenzieren sich in Tenozyten [52].

Das während des Heilungsprozesses entstandene narbenähnliche Gewebe verbleibt allerdings über Monate hyperzellulär, und der Anteil an Kollagen Typ III ist wesentlich höher (20-30% der Sehnen-Trockenmasse) als in gesundem Sehnengewebe (1-3% der Sehnen-Trockenmasse) [53-55]. Kollagen Typ III wird weniger stark quervernetzt und bildet dünnere Kollagenfibrillen verglichen mit Kollagen Typ I [56], welches der anteilig am stärksten vertretene Kollagentyp in intakten Sehnen ist (65-80% der Sehnen Trockenmasse) [57]. Dies soll zu einer Verschlechterung der ursprünglichen Zugfestigkeit und Elastizität von bis zu 30% führen [58]. Der „Heilungsprozess“ von Sehnengewebe führt daher gewöhnlich nur zu einer RepARATION und nicht zu einer Regeneration des Gewebes. Es wird meist keine volle Funktionstüchtigkeit erlangt [32, 59] und das Risiko einer nachfolgenden Verletzung oder sogar einer Ruptur ist stark erhöht [47].

Neben der chirurgischen Versorgung, welche vorwiegend bei Sehnen- und Bandrupturen zum Einsatz kommt, gibt es zahlreiche konservative Behandlungsmöglichkeiten. In Fällen akuter Verletzungen werden neben dem Kühlen, das Anlegen von Verbänden und die Schonung des betroffenen Körperteils, gefolgt von kontrollierter, langsam steigender Belastung, als konservative Therapie häufig angewendet. Zur Schmerzlinderung werden außerdem nicht-steroidale Antiphlogistika eingesetzt. Auch physikalische Methoden wie elektromagnetische Stimulation und Stoßwellentherapie werden angeboten [60, 61]. Des Weiteren können verschiedenste Substanzen in geschädigte Areale der Sehne appliziert werden, wie beispielsweise Kortikosteroide, dessen Anwendung jedoch stark umstritten ist [20, 62], aber auch Hyaluronsäure [63, 64] oder Glykosaminoglykane [65], welche Komponenten der

extrazellulären Matrix in Sehnen sind. Außerdem sind unterschiedliche auf Stammzellen [66-68] oder Wachstumsfaktoren basierende Methoden beschrieben [69-72]. Bei allen Behandlungsmöglichkeiten ist darauf zu achten, dass Sehnen während des Heilungsverlaufs nicht vollständig immobilisiert werden, da eine vorsichtige und geringe Belastung der Bildung von Adhäsionen mit dem umgebenden Gewebe vorbeugen soll [33].

Die Annahme, dass Wachstumsfaktoren und Zytokine während der Wundheilung durch stimulierende Effekte auf Zellproliferation und –differenzierung sowie auf die Bildung von Extrazellulärsubstanz eine Schlüsselrolle spielen [48, 73, 74] und dadurch möglicherweise die Vorgänge während des Heilungsverlaufs stärker in Richtung Regeneration anstelle der Reparation lenken könnten, führten zu einem bemerkenswerten Forschungsinteresse in der auf Wachstumsfaktoren basierenden Therapie. Viele verschiedene *ex vivo* und *in vivo* Experimente, wie beispielsweise verbesserte Achillessehnenheilung im Rattenmodell nach BMP-12 Gentransfer [75] oder der positive Einfluss von plättchenreichem Plasma auf Läsionen in der oberflächlichen Beugesehne bei Pferden [76] konnten bereits überzeugende Ergebnisse liefern. Des Weiteren wurden BMP-7, IGF, PDGFb oder bFGF, um nur einige zu nennen, als mögliche Kandidaten diskutiert. Da die Anwendung von rekombinanten Proteinen durch das Risiko einer unerwünschten Immunantwort limitiert ist, konzentrierte sich ein Großteil der auf Wachstumsfaktoren basierenden Forschung auf DNA Gentransfer [75, 77-79]. Das Einbringen von DNA in den Kern von Zellen, die sich nicht oder nur sehr selten teilen, ist jedoch eingeschränkt und nicht sehr effizient [80], außerdem birgt es die Gefahr von Insertionsmutagenese. Messenger RNA wurde dagegen bereits erfolgreich in unterschiedlichen Mausmodellen angewendet. Kormann *et al.* berichten von einem steigenden Hämatokrit nach einmaliger intramuskulärer Injektion von modifizierter für murines Erythropoetin kodierender mRNA, sowie einer weitest gehenden Wiederherstellung der Lunge nach Aerosolapplikation von für das Surfactant B Protein kodierender mRNA in einem

Mausmodell mit angeborener Missbildung [81]. Des Weiteren konnte in einem Myokardinfarktmodell in Mäusen durch die Applikation von für humanes VEGF kodierender mRNA eine Verbesserung der Herzfunktion und der langfristigen Überlebensfähigkeit erzielt werden [82]. Durch eine temporäre Transfektion und die Sicherheit, dass mRNA sich nicht in das Genom einbaut, könnte die mRNA basierte Transkript Therapie ein überzeugender Ansatz besonders auch im Hinblick auf pharmazeutische Sicherheit sein [83].

Um erstmalig beurteilen zu können, ob die Injektion von chemisch modifizierter mRNA in Sehnengewebe überhaupt zu Proteinexpression führt, wurde sich zunächst auf die Verwendung üblicher Reporterproteine fokussiert, welche natürlicherweise nicht im Säugetierorganismus existieren. Hierzu wurde chemisch modifizierte nackte für Luciferase oder  $\beta$ -Galaktosidase kodierende mRNA verwendet. Luciferase katalysiert die Reaktion von Luciferin mit Sauerstoff, bei welcher Biolumineszenz emittiert wird. Die Lumineszenz Emission kann mit speziellen bildgebenden Systemen erfasst werden. Das in Bakterien vorkommende Enzym  $\beta$ -Galaktosidase dagegen katalysiert die Hydrolyse von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) unter Bildung von dunkelblauem Präzipitat, welches makroskopisch oder mikroskopisch in Gewebeschnitten nachgewiesen werden kann.

In der gegenwärtigen Studie wurde zunächst die Expressionseffizienz *ex vivo* optimiert und dann nackte cmRNA *in vivo* sowohl in intakte als auch in chirurgisch, sowie chemisch geschädigte Sehnen appliziert, um das Expressionspotenzial bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen zu beurteilen und damit auch die mögliche therapeutische Anwendbarkeit von cmRNA.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Transfektion, Kultivierung und Biolumineszenzmessung *ex vivo*

Für *ex vivo* Experimente wurden Sehnen von geschlachteten (Rinder, Schweine, Schafe) oder euthanasierten Tieren (Pferde, Schafe, Ratten) verwendet. Von Pferden, Rindern, Schafen oder Schweinen stammende tiefe Beugesehnen (TBS) und von Ratten stammende Achillessehnen wurden innerhalb einer Stunde (equine Sehnen innerhalb von 4 Stunden) *post portem* entnommen und zweimal in kalter, auf Eis gelagerter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Dulbeccos's PBS, Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland), welche 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria) enthielt, gewaschen. Für Luciferase (cmRNA<sup>LUC</sup>),  $\beta$ -Galaktosidase (cmRNA<sup>LacZ</sup>) oder humanes knochenmorphogenetisches (bone morphogenetic) Protein 7 (cmRNA<sup>BMP-7</sup>) kodierende chemisch modifizierte RNA wurde in verschiedenen Lösungen und unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die Modifikation bestand durch einen Ersatz von 25% Uridin durch 2-Thiouridin und 25% Cytidin durch 5-Methyl-Cytidin. Die cmRNA wurde durch die Ethris GmbH (Planegg, Deutschland) bereitgestellt. Die Injektion der cmRNA wurde parallel zum Verlauf der Sehnenfasern durchgeführt. Für größere Sehnen wurden 23G Nadeln (Sterican, B.Braun Melsungen, Deutschland) und 1 ml Injekt-F Spritzen (B.Braun Melsungen, Deutschland) verwendet. Zur Injektion in Achillessehnen von Ratten fanden 30G Insulinspritzen (BD Micro-Fine, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) Anwendung. cmRNA<sup>LUC</sup> wurde in verschiedenen kommerziell erhältlichen, sowie eigens hergestellten Standardlösungen verdünnt. Neben Ammoniumacetat Lösung (Ammonium Acetate Solution (5 M) for molecular biology (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)) wurden verschiedenen Infusionslösungen, wie Aminosteril plus (Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg, Deutschland), Aminoven 15% (Fresenius Kabi Deutschland), HAES steril 10% (Fresenius Kabi Deutschland), Gelafundin 4% (B.Braun Melsungen), Ringer Acetat (B.Braun

Melsungen) und Ringer Laktat Lösung (AlleMan Pharma, Rimbach, Deutschland) verwendet. Des Weiteren isotonische Kochsalzlösung (NaCl) (Natriumchlorid 5,85 % Braun, Mini-Plasco connect, B.Braun Melsungen; Wasser für Injektionszwecke, B.Braun Melsungen) mit und ohne Zusatz von 5% Glukose (D(+)-Glucose Monohydrat, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und HEPES (Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Deutschland) gepufferte Glukoselösung (HBG), welche auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt und dann in vier verschiedenen Konzentrationen (2,5%, 3,75%, 5% und 10%) eingesetzt wurde. Eine Auswahl von in den Lösungen enthaltenen Stoffen findet sich in Tab. 1.

**Tab. 1. Lösungen zur Verdünnung der cmRNA<sup>LUC</sup>. Eine Auswahl der wesentlichen Inhaltsstoffe ist abgebildet.**

	Bezeichnung	Inhaltsstoffe
<b>Stickstoffverbindungen enthaltend</b>	Ammoniumacetat Lösung <sup>1</sup> Aminosteril plus <sup>1</sup>  Aminoven 15% <sup>1</sup>	Ammoniumacetat Aminosäuregehalt 100g/l, K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> Phosphat, Acetat Aminosäuregehalt 150g/l
<b>Kolloidale Lösungen</b>	HAES steril 10% <sup>1</sup> Gelafundin 4% <sup>1</sup>	Hydroxyethylstärke 100g/l, Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> Gelatinopolysuccinat 40g/l, Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>
<b>Glukose enthaltend</b>	HEPES* gepufferte Glukose 2,5% <sup>2</sup> HEPES gepufferte Glukose 3,75% <sup>2</sup> HEPES gepufferte Glukose 5% <sup>2</sup> HEPES gepufferte Glukose 10% <sup>2</sup>	12,5mM HEPES, Glukose 25g/l 18,75mM HEPES, Glukose 37,5g/l 25mM HEPES, Glukose 50g/l 50mM HEPES, Glukose 100g/l
<b>Elektrolyte enthaltend</b>	Isotonische Kochsalzlösung (NaCl) <sup>2</sup> Ringer Acetat <sup>1</sup> Ringer Laktat <sup>1</sup>	Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Acetat Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Laktat
<b>Elektrolyte und Glukose enthaltend</b>	Isotonische Kochsalzlösung + 5% Glukose <sup>2</sup> (NaCl+5%Gluc)	Glukose 50g/l, Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>

<sup>1</sup> kommerziell erhältlich, <sup>2</sup> eigens hergestellte chemische Standardlösungen, \* 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-ethansulfonsäure

cmRNA<sup>LacZ</sup> und cmRNA<sup>BMP-7</sup> wurden für *ex vivo* Experimente einzig in Kochsalzlösung gelöst verwendet.

cmRNA<sup>LUC</sup> wurde außerdem in komplexierter Form angewendet, wozu einerseits Dreamfect<sup>FM</sup> Gold (OZ Biosciences Marseille, France) nach Herstellerangaben (10µg cmRNA<sup>LUC</sup>/ 40µl Dreamfect<sup>FM</sup> Gold) verwendet wurde und andererseits 25µg cmRNA<sup>LUC</sup>

unter Verwendung von verzweigtem Polyethylenimin (brPEI) 25kDa (Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Deutschland) mit einem N/P-Verhältnis von 1:10 komplexiert wurde.

Transfizierte Sehnenproben wurden sofort nach der cmRNA Injektion in T75 Zellkulturflaschen mit belüfteten Verschlüssen (TPP Trasadingen, Schweiz) in 50ml DMEM (1X) + GlutaMAX Medium (Life Technologies Darmstadt, Deutschland), welches 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria), 2% Nystatin (Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Deutschland) und 10% FBS (Life Technologies Darmstadt) enthielt, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Biolumineszenzmessung wurde mit einem Xenogen IVIS *in-vivo* Imaging System 100 (Caliper Life Science, USA) an festgelegten Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden nach cmRNA Injektion) durchgeführt. Eine Stunde vor der Messung der Luciferaseaktivität wurde D-Luciferin Substrat (S039, SYNCHEM, Felsberg / Altenburg, Germany) in Dulbecco's PBS (1X) gelöst und zum Zellkulturmedium (100µg D-Luciferin/ml Medium) hinzugegeben. Die Messung wurde mit hoher Sensitivität (Binning 16) im Sichtfeld A und einer Belichtungszeit von einer Minute durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch manuell festgelegte Messbereiche, sog. Regions of Interest (ROI), die mit der Living Image® 2.50 Software ausgewertet wurden.

## **2. Histologie von kultivierten Sehnen**

Die  $\beta$ -Galaktosidase Färbung (X-Gal Färbung) wurde 24 Stunden nach Injektion der entsprechenden cmRNA (50µg cmRNA<sup>LacZ</sup> in NaCl 0,9% [1mg/ml]) nach dem Protokoll von Dai *et al.* [84] durchgeführt. Kontrollsehnen wurden zuvor mit cmRNA<sup>LUC</sup> (50µg in NaCl 0,9% [1mg/ml]) behandelt. Die Sehnenproben wurden dann in 0,5% Glutardialdehyd (Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) und 2mM MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Carl Roth Karlsruhe) in DPBS für 30 Minuten auf Eis fixiert. Der pH-Wert der Fixierlösung lag bei 7,4.

Danach wurden Sehnen in Waschpuffer (100mM HEPES, 5mM DTT (Dithiotreitol, Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf), 1mM MgSO<sub>4</sub> (Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Carl Roth Karlsruhe), 2% Triton X-100 (Carl Roth Karlsruhe), pH 8,0) zunächst bei Raumtemperatur für 30 Minuten und anschließend nochmal bei 50°C für eine Stunde gewaschen. Die Proben wurden dann in X-Gal Färbelösung ((1mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galaktosid, Sigma-Aldrich Chemie), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Kaliumhexacyanoferrat(III), Carl Roth Karlsruhe), 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat, Carl Roth Karlsruhe) in DPBS, pH 7,4) über Nacht ohne CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden Sehnen in 4% gepufferter Formaldehyd-Lösung (Roti® Histofix, Carl Roth Karlsruhe) fixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Paraffin eingebettet und Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Sehnen für die BMP-7 Immunohistochemie (IHC) wurden 24 Stunden nach der Injektion von cmRNA<sup>BMP7</sup> (30µg in HBG 5% [1mg/ml]) in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek, Staufen, Deutschland) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zum Versand bei -80°C gelagert. Die Anfertigung der Gefrierschnitte, sowie die Durchführung der Immunhistochemie wurden von einem externen Labor übernommen (Sophistolab AG, MuttENZ, Schweiz). Dabei wurde ein polyklonaler Kaninchen BMP-7 Antikörper als Primärantikörper verwendet (rabbit polyclonal BMP-7 antibody, ab56023 abcam plc, Cambridge, UK). Die Rotfärbung wurde durch die Aktivität von Alkalischer Phosphatase hervorgerufen.

### **3. *In vivo* Applikation von cmRNA in intakte und chirurgisch durchtrennte**

#### **Achillessehnen im Rattenmodell**

Alle Experimente wurden von der Regierung von Oberbayern im Vorfeld genehmigt und wurden nach bestehenden Richtlinien und Empfehlungen der Gesellschaft für



Versuchstierkunde durchgeführt. Weibliche Sprague Dawley Ratten (4 Monate alt, Gewicht zwischen 300g und 340g, Janvier Labs Saint-Berthevin, France) wurden in Gruppen mit Futter und Wasser *ad libitum* bei einem 12:12h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. 16 Ratten wurden für die Untersuchung der Reporterproteinkinetik benötigt und 48 Ratten für die Tenotomiestudie.

Um die Luciferasexpression in intakten Achillessehnen *in vivo* zu beurteilen, wurden die Ratten mittels Isofluraninhalation narkotisiert (3-5 vol% zur Einleitung in Inhalationskammer, gefolgt von 1,5-3 vol% zur Erhaltung über Inhalationsmaske), Luft und O<sub>2</sub> fungierten dabei als Trägergase. Verschiedene cmRNA<sup>LUC</sup> Dosen (0, 10, 20, 40 µg; Volumen: 10µl) wurden jeweils in die rechte Achillessehne appliziert (n=4/Gruppe). Die *in vivo* Lumineszenzmessung erfolgte 1, 2 und 7 Tage post cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion mit einem Photon Imager<sup>TM</sup> (Biospace Lab Nesles la Vallée, France) und wurde 15 Minuten nach der intraperitonealen Applikation von Luciferin (150mg/kg, 5ml/kg) (L-8220 in 0,9% Kochsalzlösung gelöst, Biosynth Staad, Schweiz) durchgeführt. Die Messung wurde ohne Filter über eine Dauer von 10 Minuten vorgenommen. Die Quantifizierung erfolgte durch manuell festgelegte Messbereiche, sog. Regions of Interest (ROI) im Bereich der Achillessehnen. Die Ergebnisse wurden als Gesamtaktivität (total counts) angegeben. Die Auswertung erfolgte mit M<sup>3</sup>Vision Software (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France). Die Ratten wurden danach in einer CO<sub>2</sub> Kammer euthanasiert, Achillessehnen wurden entnommen und unmittelbar nochmals die Luciferaseaktivität in den explantierten Sehnen erfasst.

Um den Einfluss von therapeutischer cmRNA<sup>BMP-7</sup> auf die frühe Heilungsphase zu untersuchen, wurde diese in die Stümpfe von chirurgisch durchtrennten Achillessehnen injiziert. Die Ratten erhielten eine Stunde vor dem Eingriff 0,05mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Reckitt Benckiser Wallisellen, Schweiz) subkutan, bevor die Anästhesie, wie schon zuvor beschrieben, mit Isofluran durchgeführt wurde. Jeweils das linke Bein wurde

zunächst rasiert und desinfiziert, bevor das Sprunggelenk mittels Fixationseinrichtung im 90° Winkel positioniert wurde. Die Hautinzision wurde kaudal über der linken Achillessehne angelegt. Die Achillessehne wurde freipräpariert und im mittleren Bereich zwischen dem Ansatz am *Tuber Calcanei* und dem Übergang zum *M. gastrocnemius* durchtrennt. Die Plantarissehne wurde dabei intakt belassen. Die Sehnenstümpfe wurden dann mit einer “Three-Loop-Pulley“-Naht wieder zusammengefügt, wobei ein nicht resorbierbarer monofiler Faden (Prolene® 5-0, 3/8 Kreis am Außenbogen schneidende Nadel P3, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Germany) verwendet wurde. Die Applikation der cmRNA<sup>BMP-7</sup> (100µg in HBG 5% [10mg/ml]) bzw. der Vehikellösung (HBG 5%) erfolgte dann unmittelbar durch Injektion von jeweils 5µl in beide Sehnenstümpfe mithilfe von Micro-Fine 29G Insulinspritzen (BD Micro-Fine, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Zuletzt wurde das subkutane Gewebe und die Haut mittels absorbierbarem Faden (Safil® 6-0, B. Braun Melsungen AG, Germany) verschlossen. Zur postoperativen Schmerzbehandlung wurde Buprenorphin (Temgesic®) für zwei Tage alle 8-12h verabreicht. Der Allgemeinzustand der Ratten, sowie der Zustand der Wunde wurden nach der OP täglich überprüft.

1, 2 und 7 Tage nach der Tenotomie wurden jeweils 8 Ratten von jeder Gruppe mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. 4 Achillessehnen jeder Gruppe wurden zum Anfertigen von Gefrierschnitten in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Weitere 4 Achillessehnen jeder Gruppe wurden über Nacht in 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie Buchs, Schweiz) für die nachfolgende Paraffineinbettung fixiert. Die BMP-7 Immunhistochemie wurde auf Paraffinschnitten durchgeführt, wozu ein polyklonaler Kaninchen Anti-BMP-7 Antikörper (abcam ab56023) als Primärantikörper verwendet wurde. Die Kollagen Typ I und Typ III Immunhistochemie wurde dagegen auf Gefrierschnitten durchgeführt. Ein polyklonaler Kaninchen Anti-Kollagen I Antikörper (abcam ab 34710) sowie ein polyklonaler Kaninchen Anti-Kollagen III Antikörper (abcam ab7778) wurden als

primäre Antikörper verwendet. Biotinylierte Ziegen Anti-Kaninchen IgG Antikörper (BA-1000, Vector Laboratories, Peterborough, UK) dienten als sekundäre Antikörper. Die bräunliche Färbung positiver Bereiche wurde durch Peroxidaseaktivität (Oxidation von Diaminobenzidin (DAB)) induziert. Schnitte wurden außerdem mit Hämatoxylin (VWR International, Dietikon, Schweiz) gegengefärbt. In den mikroskopischen Bildern wurden dann Schwellenwerte für die DAB Färbung gesetzt und mittlere Graustufen der positiven Pixel analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Fiji/Image J Version 1.49k.

#### **4. Sehnendefektetablierung *ex vivo* und nachfolgende Transfektion**

Ovine explantierte Beugeschnen wurden mit Kollagenase-Lösung oder, in Anlehnung an Watts, Nixon *et al.*'s Defektmodell [42], mit Kollagenase-Gel injiziert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium kultiviert (siehe S. 10ff 1. Transfektion, Kultivierung und Biolumineszenzimagining *ex vivo*). Zu diesem Zweck wurden 500 Collagen Digestion Units (CDU) der Kollagenase Typ 1A (von *Clostridium histolyticum* C0130, Sigma-Aldrich Chemie Schnelldorf, Deutschland) in Dulbecco's PBS (1X) gelöst (150µl für Kollagenase-Lösung, 50µl für Kollagenase-Gel), steril filtriert und in die Sehnen appliziert. Für das Kollagenase-Gel wurde die zuvor erzeugte Kollagenase-Lösung (500 CDU in 50µl) mit 50µl Thrombinlösung (Komponente 2, Tissucol Duo S Immuno, Baxter Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) vermischt und mit Hilfe eines Duploject Systems (Baxter Deutschland), in welchem die Kollagenase-Thrombin-Lösung mit 50µl Proteinklebelösung (Komponente 1, Tissucol Duo S Immuno, Baxter Deutschland) während der Injektion vermischt wurde, appliziert. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation wurden die Sehnen auf Effekte der Kollagenaseinjektion makroskopisch untersucht.

Um zu prüfen, ob sich chemisch geschädigtes Sehnengewebe transfizieren lässt, wurden 50µg cmRNA<sup>LUC</sup> in HBG 5% [0,5 mg/ml] 24 Stunden nach der Kollagenaseapplikation injiziert.

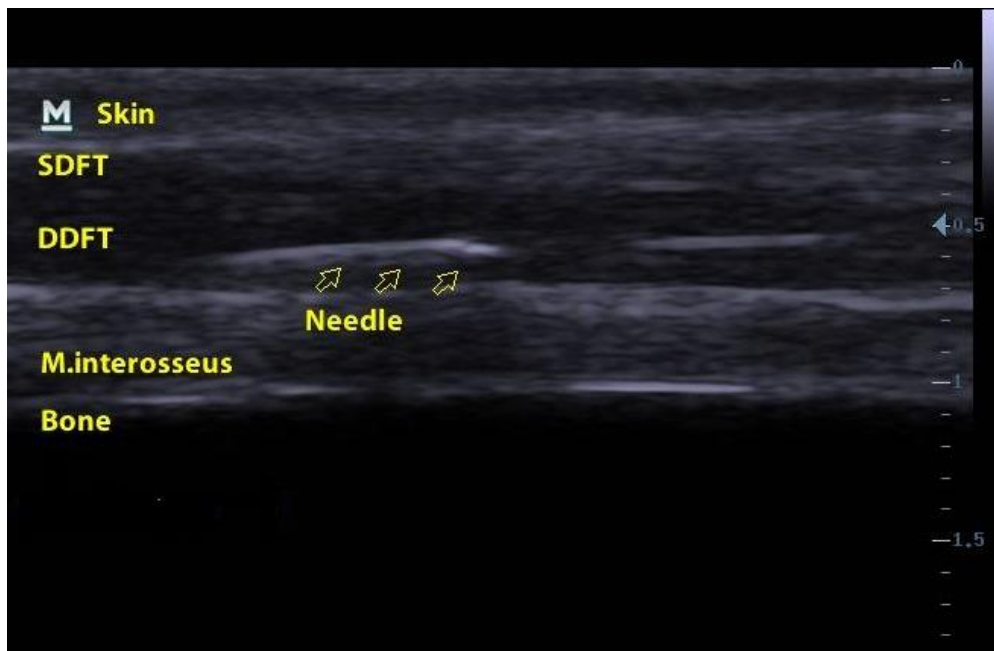
Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Sehnenstücke auf Luciferaseaktivität untersucht. Das Vorgehen erfolgte wie bei *ex vivo* Transfektionsversuchen an intakten Sehnen (siehe S.10ff 1. Transfektion, Kultivierung und Biolumineszenzimaging *ex vivo*).

## **5. Sehnendefektmodell und *in vivo* Proteinexpression im Schaf**

Alle Experimente wurden von der Regierung von Oberbayern im Vorfeld genehmigt und wurden nach bestehenden Richtlinien und Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde durchgeführt. Für die Großtierexperimente wurden 9 weibliche Merinoschafe (Schafhof Schleich, Kirchstockach, Deutschland) in Gruppen bei einem 12:12h Hell-Dunkel-Rhythmus mit Heu und Wasser *ad libitum* untergebracht. Die Tiere waren zwischen 4 und 7 Jahren alt und wogen zwischen 72kg und 87kg. Alle Schafe hatten weder klinisch noch ultrasonographisch Anzeichen von Sehnenschädigungen. Der Eingriff erforderte die Durchführung einer Narkose. Die Schafe wurden zunächst mit Diazepam (Diazepam-ratiopharm® 10mg/2ml Injektionslösung, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) sediert und die Narkose nachfolgend mit Propofol (Narcofol® 10mg/ml, CP-Pharma Handesgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland) eingeleitet. Nach Intubation wurde die Narkose durch Isofluraninhalation (Isofluran CP 1ml/ml, CP-Pharma) aufrechterhalten.

Zur Induktion der Sehnendefekte wurde das zuvor *ex vivo* getestete Kollagenase-Gel Defektmodell angewendet [42]. Beide Hintergliedmaßen wurden im Metatarsalbereich geschoren, rasiert und desinfiziert, bevor entweder 500 (n=3), 200 (n=3) oder 100 (n=3) Collagen Digestion Units (CDU) der Kollagenase Typ 1A (von *Clostridium histolyticum* C0130, Sigma-Aldrich Chemie Schnellendorf, Deutschland) in die tiefe Beugesehne (TBS) der linken Hintergliedmaße injiziert wurde. Die Kollagenase wurde vorher in 50µl Dulbecco's PBS (1X) gelöst, steril filtriert und mit 50µl Thrombinlösung (Komponente 2, Tissucol Duo S

Immuno, Baxter Deutschland) vermengt. Die Injektion erfolgte von lateral im mittleren Metatarsalbereich unter Ultraschallkontrolle (Mindray DP 50 vet, Sonoring Schmitt-Haverkamp, Germany). Dazu wurde eine 23G Nadel, sowie ein Duploject System (Baxter Germany) benötigt, in welchem die Kollagenase-Thrombinlösung mit 50µl Proteinklebelösung (Komponente 1, Tissucol Duo S Immuno, Baxter Deutschland) während der Injektion vermischt wurde. Abb. 1 zeigt ein longitudinales Ultraschallbild eines Hinterbeins im plantaren Metatarsalbereich mit einer in die TBS eingeführten Nadel kurz vor der Injektion des Kollagenase-Gels. Um sicherzugehen, dass die Gelbildung abgeschlossen war, wurde die Nadel erst 30 Sekunden nach Applikation wieder entfernt. Die Stelle, an der die Nadel eingesteckt worden war, wurde mit einem Knopfheft markiert.



**Abb. 1. Ultraschall Längsaufnahme des Beugesehenpakets einer Hintergliedmaße beim Schaf.** Die Nadel wurde kurz vor der Kollagenaseinjektion im zentralen Bereich der TBS platziert. (Skin [engl.] = Haut, SDFT [engl.] = Superficial Digital Flexor Tendon [engl.] = TBS, DDFT [engl.] = Deep Digital Flexor Tendon [engl.] = OBS, M. interosseus = Musculus interosseus, Bone [engl.] = Metatarsalknochen, Needle [engl.] = Nadel)

Des Weiteren wurden jeden zweiten Tag (Tag 0, Tag 2, Tag 4) Antibiotika (Veracin® compositum 3ml/50kg, Albrecht, Aulendorf, Deutschland) intramuskulär appliziert. Zur

analgetischen Nachsorge wurden 0,3mg Buprenorphin-Hydrochlorid (Buprenovet® Multidose 0,3mg/ml, Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany) alle 12 Stunden für 2 Tage und 3mg/kg Ketoprofen (Romefen® PR 10%, Merial, Hallbergmoos, Germany) alle 24 Stunden für fünf Tage subkutan verabreicht. Die Tiere wurden täglich klinisch untersucht. Regelmäßige Ultraschall Untersuchungen wurden mit einem tragbaren Mindray DP 50 vet Ultraschallgerät (Sonoring Schmitt-Haverkamp, Deutschland) und einer 5-12 MHz Linearsonde (Mindray, 75L38EA) durchgeführt. Die Sehnen der Schafe wurden am stehenden Tier mit belasteter Gliedmaße geschallt. Der Durchmesser der TBS wurde in der mittleren Tarsalregion plantar 2cm unterhalb des Knopfheftes ermittelt. Die äußerliche Dicke wurde in der 100 CDU Gruppe von medial nach lateral im selben Bereich mit einem digitalen Messschieber ermittelt.

Sechs Tage nach der Kollagenaseinjektion wurde cmRNA<sup>LUC</sup> in HBG 5% [1mg/ml] gelöst, in die gesunde sowie geschädigte TBS der Hintergliedmaßen appliziert. Der Eingriff wurde ebenfalls unter Narkose durchgeführt. Die cmRNA<sup>LUC</sup> wurde durch zwei Injektionen mit je 100µg (500 CDU Gruppe, n=2), 200µg (200 CDU Gruppe, n=2) oder 250µg (100 CDU Gruppe, n=2) cmRNA proximal und distal des Defektes unter Ultraschallkontrolle appliziert und in gleicher Weise in das gesunde kontralaterale Bein. Um sicher zu gehen, dass Spritze und Nadel vollständig entleert werden, wurde etwas Luft in die Spritze aufgezogen und am Ende der Injektion appliziert. 3mg/kg Ketoprofen (Romefen® PR 10%) wurde während der Narkose intravenös verabreicht. Am folgenden Tag wurden die Schafe durch eine intravenöse Überdosis Pentobarbital-Natrium (Euthadorm®, CP-Pharma, Burgdorf, Germany) euthanasiert und TBS wurden innerhalb einer Stunde *post mortem* entnommen. Lockeres Bindegewebe und Sehnenscheiden wurden entfernt. Entnommene Sehnen wurden dann unmittelbar in D-Luciferin-Lösung (100µg D-Luciferin/ml PBS (1x)) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für eine Stunde inkubiert, bevor die Biolumineszenz im Xenogen IVIS *in-vivo* Imaging

System 100 (Caliper Life Science, USA) detektiert wurde. Die Messungen wurden im Sichtfeld A mit hoher Sensitivität (Binning 16) und einer Belichtungszeit von 1 Minute durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch manuell festgelegte Messbereiche, sog. Regions of Interest (ROI), die mit der Living Image® 2.50 Software ausgewertet wurden. Die Sehnen wurden dann in 4% gepufferter Formaldehyd-Lösung (Roti® Histofix, Carl Roth Karlsruhe) für 24 Stunden fixiert. Nach der Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe folgte die Einbettung in Paraffin. In den intakten Sehnen wurden fünf Abschnitte im cmRNA<sup>LUC</sup> injizierten Bereich, sowie Areale 3cm proximal und distal der Injektionsstelle untersucht. In geschädigten Sehnen wurden sowohl zentrale als auch periphere Bereiche des Schadens ausgewählt. 3µm Schnitte wurden für die histopathologische Untersuchung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Blutproben wurden an Tag 0, Tag 6 (vor cmRNA Applikation) und Tag 7 (vor der Euthanasie) genommen. Es wurde jeweils ein großes Blutbild angefertigt, sowie außerdem Leber- und Nierenwerte von einem externen Veterinärlabor untersucht.

## **6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM mit n gleich der Anzahl der Proben/Tiere pro Gruppe dargestellt. Unterschiede wurden mit dem Mann Whitney U Test auf Signifikanz untersucht, welche bei  $p < 0,05$  erzielt wurde. Die Ergebnisse in Abb. 6G, H und Tab. A2 sind als Mittelwert  $\pm$  SD gezeigt.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Injektion von cmRNA resultiert *ex vivo* in hoher Proteinexpression

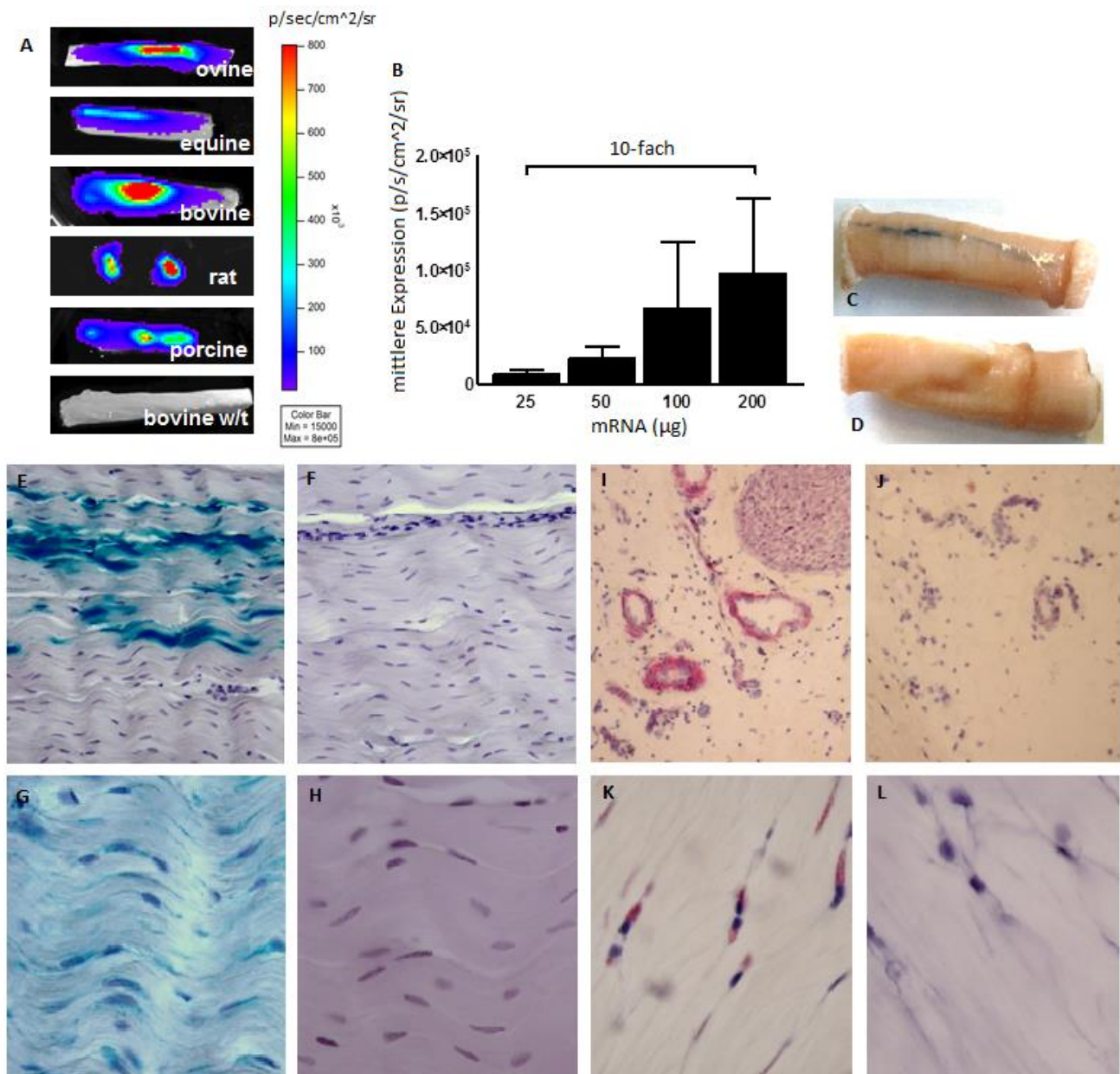
Um zu ergründen, ob chemisch synthetisierte Messenger RNA Sehnengewebe transfizieren kann und dadurch therapeutisch wirksame Proteine exprimiert werden können, wurde nackte chemisch modifizierte Messenger RNA (cmRNA), gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, in explantierte Sehnen injiziert. Ein initiales *ex vivo* Experiment wurde in explantierten porcinen tiefen Beugesehnen durchgeführt. Die Transfektion des Sehnengewebes mit anschließender Proteinexpression (Luciferase) konnte durch Injektion von cmRNA<sup>LUC</sup> (100µg in NaCl 0,9% [1mg/ml]), und anschließender Inkubation (24 Stunden, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) erzielt werden. Die Luciferaseaktivität wurde 24 Stunden nach Injektion ermittelt und konnte in Proben, die mit cmRNA<sup>LUC</sup> behandelt worden sind, nicht jedoch in unbehandelten Kontrollen oder Sehnen, die allein mit Kochsalzlösung injiziert worden sind, nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden weitere Experimente mit explantierten Sehnen von unterschiedlichen Tierspezies durchgeführt, um zu prüfen, ob die *ex vivo* Transfektion auch im Sehnenmaterial anderer Säugetiere erfolgreich angewendet werden kann. Interessanterweise konnte durch die Injektion von nackter cmRNA<sup>LUC</sup>, neben der Expression in porcinen Sehnen auch eine ausgeprägte Luciferaseexpression in explantierten Sehnen von Schafen, Rindern, Pferden oder Ratten nachgewiesen werden (Abb. 2A). Die Expression wies dabei ein Verteilungsmuster mit höchster Luciferaseaktivität an der Injektionsstelle, sowie einem länglichen, das Sehnenstück durchziehenden aktiven Bereich auf.

In einem weiteren Experiment konnte in porcinen Sehnen nachgewiesen werden, dass die aus der cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion resultierende Luciferaseexpression dosisabhängig ist (Abb. 2B). Um die Art der transfizierten Zellen identifizieren zu können, wurde für  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) kodierende cmRNA (50µg cmRNA<sup>LacZ</sup> in NaCl 0,9% [1mg/ml]) in Schweinesehnen injiziert



und die Aktivität durch eine X-Gal Färbung 24 Stunden nach Injektion ermittelt. Das durch  $\beta$ -Gal Aktivität entstandene blaue Präzipitat konnte in  $\text{cmRNA}^{\text{LacZ}}$  behandelten Sehnen bereits makroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 2C). Ähnlich wie das Verteilungsmuster der Luciferaseexpression wurde auch die Blaufärbung in einem dünnen das Sehnenstück durchziehenden Streifen sichtbar.  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  behandelte Kontrollsehnen wiesen nach der  $\beta$ -Gal Färbung keine Blaufärbung auf (Abb. 2D). Histologisch konnte die höchste  $\beta$ -Gal Expression im Bereich der Injektionsstelle in Tenozyten und Bindegewebszellen lokalisiert werden (Abb. 2E, F). In Gewebeschnitten von  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  (50 $\mu\text{g}$  in NaCl 0,9% [1mg/ml]) behandelten Kontrollsehnen wurde dagegen keine  $\beta$ -Gal Aktivität beobachtet (Abb. 2G, H).

Nachdem die Experimente mit Reporterprotein  $\text{cmRNA}$  überzeugende Ergebnisse geliefert hatten, sollte eine mögliche Anwendbarkeit der Transkripttherapie mit therapeutischen Proteinen untersucht werden. Als therapeutisches Target wurde humanes BMP-7 ausgewählt, da es sich durch tenozytenstimulierende Effekte möglicherweise positiv auf die Sehnenheilung auswirken könnte [85, 86]. Experimente mit  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  (30 $\mu\text{g}$  in NaCl 0,9% gelöst [1mg/ml]) wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie sie zuvor schon mit Reporterproteinen durchgeführt worden waren. Da für mögliche nachfolgende Experimente Ratten verwendet werden sollten, wurde  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  in explantierte Achillessehnen von Ratten injiziert und nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine BMP-7 Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. BMP-7 konnte in  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  transfizierten Sehnenproben vermehrt in Gefäßwänden, lockerem Bindegewebe, sowie Tenozyten nachgewiesen werden (Abb. 2 I, K). Unbehandelte Kontrollsehnen wiesen einzig ein schwach positives Signal in Gefäßwänden auf (Abb. 2 J, L).



**Abb. 2. Proteinexpression in intakten explantierten Sehnen nach Injektion von nackter cmRNA.**

(A) Biolumineszenz Imaging (BLI) 24 Stunden nach Injektion von cmRNA<sup>LUC</sup> in explantierte Sehnen unterschiedlicher Spezies. Es wurden 26,6 μg [0,65mg/ml] (rat), 50 μg [0.5mg/ml] (bovine, equine) oder 100 μg [1mg/ml] (porcine, ovine) nackte cmRNA<sup>LUC</sup> injiziert. Expression wurde in allen getesteten Spezies nachgewiesen. (B) Luciferaseexpression ist dosisabhängig. Porcine Sehnen wurden mit 25 μg, 50 μg, 100 μg oder 200 μg cmRNA<sup>LUC</sup> gelöst in 250 μl isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) injiziert. Mittelwerte der Expression ± SEM 24 Stunden nach Injektion (n=4). (C) Porcine Sehne 24 Stunden nach Injektion von cmRNA<sup>LacZ</sup> (50 μg cmRNA<sup>LacZ</sup> in NaCl 0,9% [1mg/ml]) und anschließender X-Gal Färbung wies makroskopisch sichtbares blaues Präzipitat auf, welches in einem dünnen Streifen in Längsrichtung verteilt war. (D) Kontrollsehne 24 Stunden nach cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion und X-Gal Färbung verblieb ohne β-Gal Aktivität. (E, F, G, H) X-Gal gefärbte Schnitte einer cmRNA<sup>LacZ</sup> (50 μg cmRNA<sup>LacZ</sup> in NaCl 0,9% [1mg/ml]) injizierten (E, G) und einer cmRNA<sup>LUC</sup> (50 μg cmRNA<sup>LUC</sup> in NaCl 0,9% [1mg/ml]) injizierten porcinen Sehne (F, H) gegengefärbt mit Hämatoxylin. β-Galaktosidase wurde vermehrt lokal im Bereich der Injektionsstelle exprimiert (E) und konnte in Tenozyten (G) sowie lockerem Bindegewebe nachgewiesen werden, wohingegen cmRNA<sup>LUC</sup> behandelte Kontrollsehnen keine β-Gal Aktivität aufwiesen (F, H).

E, F Vergrößerung x20. G, H Vergrößerung x40. (I, J, K, L) BMP-7 Immunhistochemie in Schnitten von cmRNA<sup>BMP-7</sup> (30µg in NaCl 0,9% [1mg/ml]) behandelten Achillessehnen von Ratten (I, K) sowie unbehandelten Kontrollen (J, L) gegengefärbt mit Hämatoxylin. Positive Signale wurden rot angefärbt. BMP-7 wurde in cmRNA<sup>BMP-7</sup> injizierten Sehnen vermehrt in Gefäßwänden, lockerem Bindegewebe (I) sowie Tenozyten (K) nachgewiesen. I, J Vergrößerung x10. K, L Vergrößerung x40.

## 2. Glukose verbessert, Aminosäuren verschlechtern die Luciferaseexpression

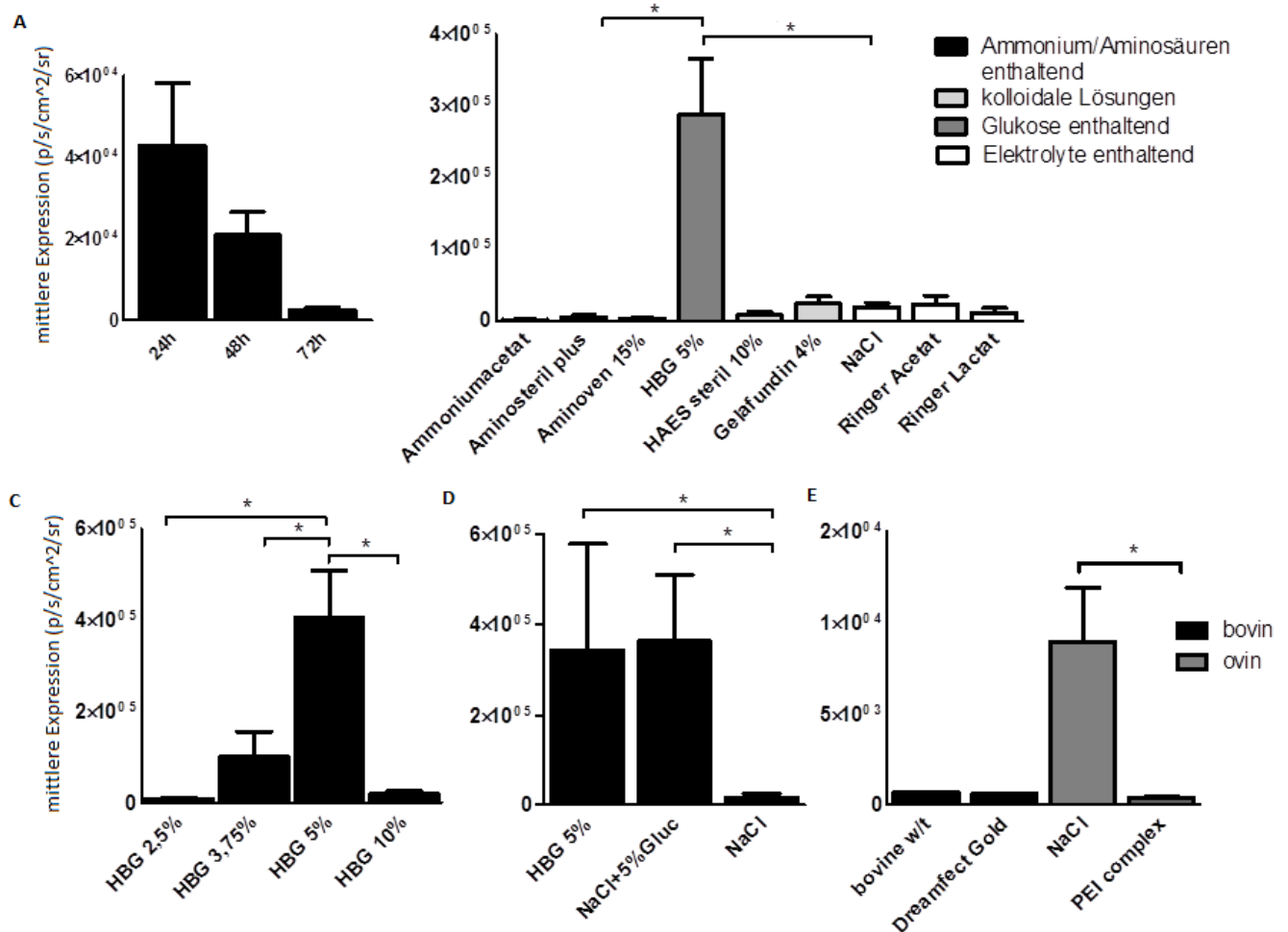
Da bovines Sehnengewebe in initialen Experimenten die stärkste Expression aufwies, wurden folgende Experimente zunächst auch mit bovinen Sehnen durchgeführt. Die Untersuchung der Expressionskinetik lieferte höchste Werte 24 Stunden nach cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion und einen deutlichen Abfall (2-fach) nach 48 Stunden. 72 Stunden *post injectionem* war die Luciferaseexpression nahezu auf Werte des Hintergrundrauschens abgefallen (Abb. 3A).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Transfektion des Sehnengewebes bzw. die transgene Expression durch den Einsatz verschiedener kommerziell erhältlicher oder eigens hergestellter chemischer Standardlösungen, welche Aminosäuren, Elektrolyte und/oder Zucker enthielten noch verstärkt werden könnte. Folgende Hypothesen lagen zugrunde: (1) ein osmotischer Gradient könnte den Elektrolyteinstrom und damit auch die Aufnahme der cmRNA ins Innere der Zelle beeinflussen, (2) die Bereitstellung von zusätzlichen Aminosäuren könnte die Translation der cmRNA verbessern, (3) mit Ammoniumacetat gefällte cmRNA könnte einen “Depoteffekt” bewirken und dadurch möglicherweise in einer länger andauernden Expression resultieren. Außerdem wurden kolloidale Lösungen verwendet, um den Einfluss von größeren Molekülen auf die Transfektion von Sehnengewebe zu bewerten. Da zuvor die höchsten Expressionswerte 24 Stunden nach cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion ermittelt worden waren, wurde dieser Messzeitpunkt auch für den Vergleich der unterschiedlichen Lösungen festgelegt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Lösung, in welcher die cmRNA appliziert wurde, einen starken Einfluss auf die Luciferaseexpression hatte. Der Effekt war besonders auffällig, wenn elektrolyt- und/oder glukosehaltige Lösungen mit aminosäurehaltigen Lösungen verglichen

wurden (Abb. 3B). Bemerkenswerterweise ergab die Verwendung von HEPES gepufferter Lösung mit einem Glukosegehalt von 5% (HBG 5%) die höchste Luciferaseexpression, verglichen mit kochsalzhaltiger (15-fach,  $P < 0,05$ ) oder aminosäurehaltiger Lösung (57-fach verglichen mit Aminosteril plus,  $P < 0,05$ ).  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  in kolloidalen Lösungen ergab nur sehr niedrige Expressionswerte und Ammoniumacetat-Lösung führte zu keinerlei Expression. Ferner stellte sich die Frage, ob die Transfektionseffizienz durch die Glukosekonzentration beeinflusst werden könnte. Die Luciferaseexpression war am höchsten wenn eine Glukosekonzentration von 5% verwendet wurde und fiel deutlich ab, wenn die Konzentration entweder erhöht (20-fach geringer) oder verringert (50-fach geringer) wurde (Abb. 3C). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen auch für weitere Spezies gelten, wurden für weitere Experimente porcine Sehnen verwendet. Es wurde weiterhin untersucht, ob das Mischen von Glukose und Elektrolyten zu einer weiteren Verbesserung der Transfektionseffizienz führen könnte. Durch die Kombination von 5% Glukose mit Kochsalz ( $\text{NaCl} + 5\% \text{Gluc}$ ) konnte, verglichen mit HBG 5%, keine Verbesserung der Luciferaseexpression erzielt werden ( $p = 0,88$ ) (Abb. 3D).

Da mRNA üblicherweise in Carrier-Formulierungen verabreicht wird, wurde außerdem die Transfektionseffizienz von  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$ , die mit Lipid- bzw. Polymer-Carriern komplexiert war, in unterschiedlichen Spezies analysiert (Abb. 3E). Interessanterweise ergab mit Dreamfect<sup>FM</sup> Gold komplexierte  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  nur Expressionslevels, die vergleichbar waren mit dem Hintergrundsignal von w/t Proben. Außerdem war die Luciferaseexpression in Sehnen, die mit brPEI komplexierter  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  behandelt worden waren, 22-fach geringer als in Sehnen, die mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  gelöst in NaCl injiziert worden waren.



**Abb. 3. Expressionskinetik und Vergleich verschiedener Lösungen bei der Anwendung von nackter cmRNA<sup>LUC</sup> ex vivo.** (A) Kinetik der Luciferaseexpression in bovinen explantierten Sehnen. 50µg cmRNA<sup>LUC</sup> [0,5mg/ml] wurden in isotonischer Kochsalzlösung gelöst injiziert. Durchschnittliche Expressionswerte  $\pm$  SEM 24h, 48h und 72h nach Injektion (n  $\geq$  10). Höchste Expression wurde 24 Stunden nach Injektion ermittelt. Innerhalb von 72h fiel Luciferaseaktivität auf Stärke des Hintergrundsignals ab. (B) 50µg cmRNA<sup>LUC</sup> [0,25mg/ml] in unterschiedlichen Lösungen gelöst, wurde in bovine Sehnen injiziert (n  $\geq$  5). Die vertikale Achse zeigt die mittleren Expressionwerte, die horizontale Achse die verschiedenen Lösungen, die zur Verdünnung verwendet worden sind. Abbildung zeigt mittlere Expression  $\pm$  SEM 24 Stunden nach Injektion. Signifikant höhere Expression wurde bei der Verwendung von HBG 5% (15-fold) verglichen mit NaCl-Lösung (\*, p < 0,05) und (57-fold) Aminosteril plus (\*, p < 0,05) nachgewiesen. (C) Vergleich unterschiedlicher HBG Konzentrationen. Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM der Luciferaseexpression 24 Stunden nach der Injektion von 50µg cmRNA<sup>LUC</sup> [0,5mg/ml] (n  $\geq$  5). HBG 5% resultierte verglichen mit 2,5% (50-fach), verglichen mit 10% (20-fach) und verglichen mit 3,75% (4-fach) in signifikant höherer Expression (\*, p < 0,05). (D) Vergleich von glukosehaltiger Lösung und Lösung ohne Glukose. 50µg cmRNA<sup>LUC</sup> [0,5 mg/ml] wurden 24 Stunden vor dem BLI in porcine Sehnen injiziert (n=5). Mittelwerte  $\pm$  SEM der Luciferaseexpression sind abgebildet. Mittlere Luciferaseexpression von cmRNA<sup>LUC</sup> gelöst in HBG 5% und in NaCl+5%Gluc waren signifikant höher (20-fach bei HBG 5% und 21-fach bei NaCl+5%Gluc) verglichen mit isotonischer Kochsalzlösung (\*, p < 0,05). (E) Vergleich von cmRNA<sup>LUC</sup> komplexiert mit Carriersystemen und cmRNA<sup>LUC</sup> gelöst in isotonischer Kochsalzlösung. Durchschnittliche Luciferaseaktivität von cmRNA<sup>LUC</sup> komplexiert mit Lipid- oder Polymer-Carriern lieferte in bovinen sowie ovinen Sehnen nur vergleichbare Werte mit dem Hintergrundsignal von w/t Sehnen. Mittlere Expression von 25µg cmRNA<sup>LUC</sup> gelöst in Kochsalzlösung war 22-fach höher verglichen mit 25µg cmRNA<sup>LUC</sup> komplexiert mit brPEI (\*, p < 0,05).

### 3. Nackte cmRNA führt *in vivo* in intakten Sehnen zu dosisabhängiger

#### Expression

Um zu prüfen, ob die Beobachtungen aus den *ex vivo* Experimenten auf die *in vivo* Situation übertragen werden können, wurde cmRNA<sup>LUC</sup> in unterschiedlichen Dosen (40, 20, 10 und 0 µg) in Achillessehnen von Ratten appliziert. Die cmRNA<sup>LUC</sup> wurde in HBG 5% gelöst (pH 7,4), weil diese in den vorangegangenen Experimenten die höchste Expression geliefert hatte. Die Luciferaseaktivität wurde mittels *in vivo* BLI 1, 2 und 7 Tage nach der Injektion durchgeführt (Abb. 4A). Eine dosisabhängige Luciferaseexpression, wie sie zuvor in explantierten Schweinesehnen ermittelt wurde (Abb. 2B), konnte auch *in vivo* in Achillessehnen von Ratten festgestellt werden. Die Expressionskinetik war vergleichbar mit *ex vivo* Ergebnissen in bovinen Sehnen (Abb. 3A). Die höchste Expression konnte ebenfalls 24 Stunden nach der cmRNA Injektion festgestellt werden, welche dann im Laufe des Experiments auf sehr niedrige, aber noch erfassbare Werte an Tag 7 absank (Abb. 4B).

### 4. Positiver Einfluss nackter cmRNA<sup>BMP-7</sup> auf frühe Heilungsphase in

#### durchtrennten Achillessehnen im Rattenmodell

Das therapeutische Potenzial von humanem BMP-7 auf die Sehnenheilung wurde in Ratten mit chirurgisch durchtrennten und nachfolgend wieder adaptierten Achillessehnen untersucht. Der Einfluss auf den Heilungsprozess wurde mittels histologischer Untersuchung an Tag 1, 2 und 7 post OP und Injektion von mRNA<sup>BMP-7</sup> oder Vehikel (HBG 5%) bewertet.

Um beurteilen zu können, ob die Injektion von cmRNA<sup>BMP-7</sup> zu einer Expression von therapeutischem Protein geführt hat, wurde in den entnommenen Sehnen eine BMP-7 Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Verglichen mit unbehandelten kontralateralen Kontrollsehnen (Abb. 4D), in denen nur ein leichtes Hintergrundsignal durch endogenes BMP-7 nachgewiesen wurde, war die BMP-7 Expression in allen operierten Sehnen von

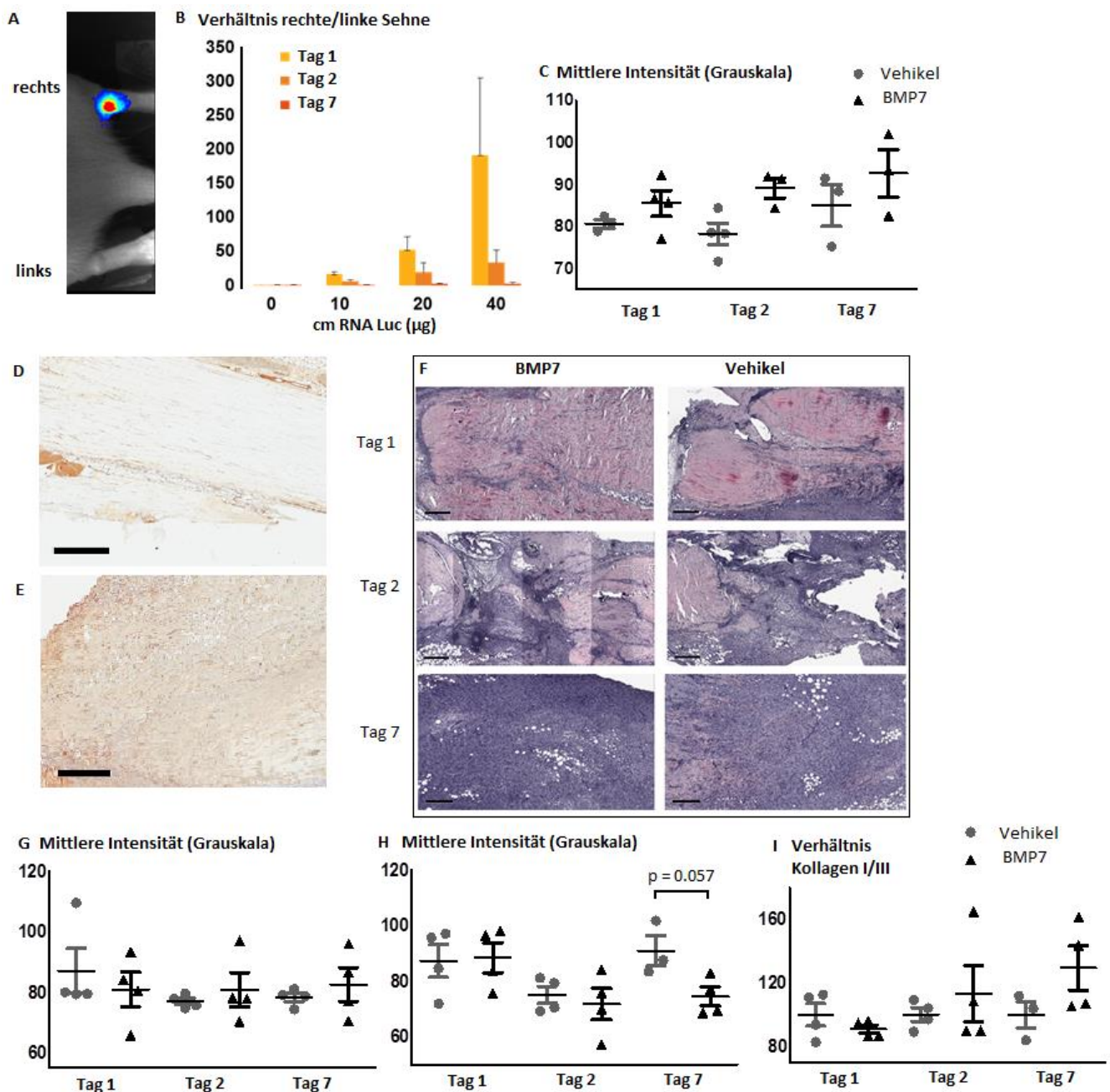
Tag 1 bis zum Ende der Studie an Tag 7 deutlich erhöht, ganz gleich, ob sie mit  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  oder nur mit der HBG 5% Vehikellösung (Abb. 4E) behandelt worden waren. Dennoch war ein Trend ersichtlich, dass BMP-7 während des gesamten Experiments in  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelten Sehnen stärker exprimiert wurde als in Vehikel behandelten Sehnen (Abb. 4C).

Am Tag 1 post OP zeigte die histopathologische Untersuchung der geschädigten Achillessehnen in beiden Gruppen eine unspezifische Entzündungsreaktion, sowie mehr oder weniger ausgeprägte nekrotische Bereiche mit oder ohne Hämatom. In beiden Gruppen konnte eine erhöhte mitotische Aktivität der Tenozyten beobachtet werden. Die mitotische Aktivität war in Sehnen, die mit  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelt worden waren allerdings noch etwas ausgeprägter. Am Tag 2 nach dem chirurgischen Eingriff waren weiterhin entzündliche und proliferative Prozesse in beiden Gruppen ersichtlich. Am Tag 7 war in allen Proben bereits eine zellreiche Bindegewebsbrücke zwischen den beiden Sehnenstümpfen ausgebildet (Abb. 4F).

In der Auswertung der IHC-Schnitte für Kollagen I und III wurden einige Trends ersichtlich: Der Mittelwert der mittleren Intensität von Kollagen I fiel in der Vehikelgruppe von Tag 1 auf Tag 2 leicht ab, wohingegen der Mittelwert in  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelten Sehnen stabil blieb. Auf den Abfall folgte in beiden Gruppen ein leichter Anstieg bis Tag 7. Dabei war an Tag 2 und 7 der Mittelwert in Sehnen höher, die mit  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelt worden waren, verglichen mit den Vehikel behandelten (Fig. 4G). Im Gegensatz dazu fiel der Mittelwert der Intensität von Kollagen III von Tag 1 auf Tag 2 in beiden Gruppen ab, allerdings stärker in der  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  Gruppe, gefolgt von einem ausgeprägten Anstieg von Tag 2 bis Tag 7 in der Vehikelgruppe. An Tag 7 war die mittlere Intensität für Kollagen III in Sehnen, die mit  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelt worden waren, deutlich geringer als in Vehikel behandelten Sehnen ( $p = 0,057$ ) (Abb. 4H). Außerdem war das Verhältnis der Mittelwerte der mittleren



Intensitäten von Kollagen Typ I relativ zu Typ III in der BMP-7 Gruppe am Tag 2 und Tag 7 höher als in der Vehikelgruppe (Abb. 4I).



**Abb. 4. Proteinexpression in intakten und geschädigten Ratten Achillessehnen *in vivo*.** (A) *In vivo* BLI 24 Stunden nach cmRNA<sup>LUC</sup> Injektion in intakte rechte Achillessehne (20µg in HBG 5% [2mg/ml]). (B) Kinetik und Dosisabhängigkeit der Luciferaseexpression in intakten Achillessehnen. Luciferin wurde 15 Minuten vor der Messung intraperitoneal verabreicht (Mittelwert  $\pm$  SEM, n=4) (C) Mittlere Intensität in BMP-7 immunhistochemischen Schnitten von Achillessehnen 1, 2 und 7 Tage nach OP und cmRNA<sup>BMP-7</sup> bzw. Vehikel Injektion. Ein Trend in Richtung erhöhter BMP-7 Intensität wurde in der cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe ersichtlich (n  $\geq$  3). (D) BMP-7 IHC von un behandelter intakter Sehne (E) und Vehikel behandelter geschädigter Sehne 1 Tag post OP. Positives Signal ist bräunlich gefärbt. Maßstabssymbol



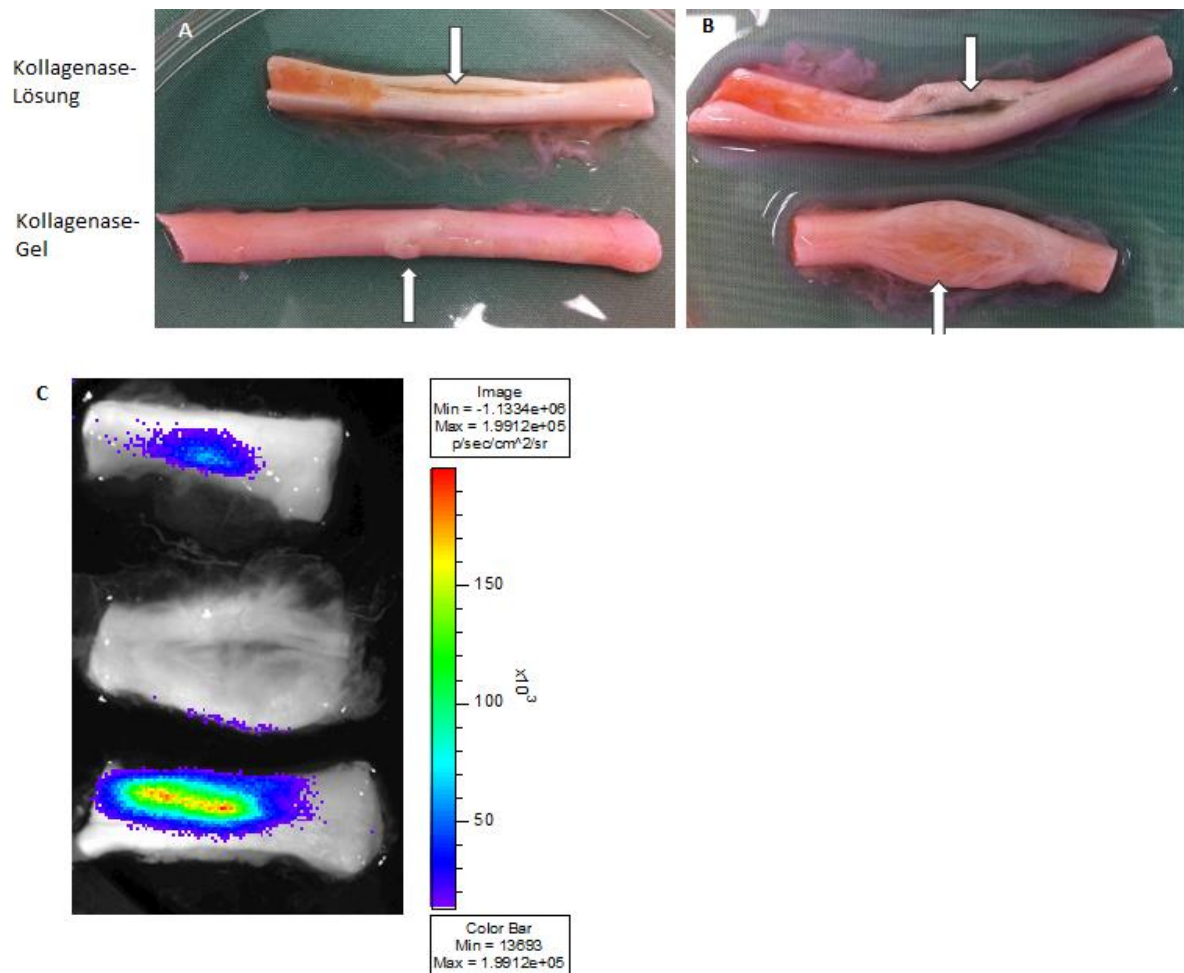
entspricht einer Länge von 500µm. **(F)** H.E. gefärbte Schnitte von Achillessehnen, die entweder mit cmRNA<sup>BMP-7</sup> oder Vehikel behandelt worden sind 1, 2 und 7 Tage nach der OP. Das Maßstabssymbol entspricht einer Länge von 400µm. **(G)** Mittlere Intensität der Kollagen I Immunhistochemie von cmRNA<sup>BMP-7</sup> oder Vehikel behandelten Achillessehnen 1, 2 und 7 Tage post OP. Trend höherer Intensitäten an Tag 2 und Tag 7 in cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelten Sehnen im Vergleich zu Vehikel behandelten Sehnen ( $n \geq 3$ ). **(H)** Mittlere Intensität der Kollagen III Immunhistochemie von Achillessehnen 1, 2 und 7 Tage post OP cmRNA<sup>BMP-7</sup> und Vehikel behandelter Sehnen. Trend in Richtung niedrigerer Kollagen III Intensität in cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelten Sehnen am Tag 7 verglichen mit der Vehikelgruppe ( $p = 0,057$ ,  $n \geq 3$ ). **(I)** Verhältnis der mittleren Intensitäten von Kollagen Typ I relativ zu Kollagen Typ III von entweder cmRNA<sup>BMP-7</sup> oder Vehikel behandelten Achillessehnen an Tag 1, 2 und 7 post OP. Trend in Richtung eines höheren Kollagen I/III Verhältnisses in cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelten Sehnen verglichen mit Vehikel behandelten Sehnen ( $n \geq 3$ ).

## 5. Die Injektion von Kollagenase-Gel lässt *ex vivo* Läsionen mit aufgelockerter

### Struktur entstehen

Tendinopathisches Gewebe ist besonders durch Matrixzerstörung mit gelockerter Faserstruktur, erhöhter Zelldichte und dem Einsprossen von Gefäßen charakterisiert. Da diese Gegebenheiten nicht mit denen von intakten oder chirurgisch durchtrennten Sehnen verglichen werden können, wurde ein Defektmodell mit chemischer Schädigung etabliert. Ovine Beugesehnen wurden *ex vivo* entweder mit Kollagenase-Lösung oder Kollagenase-Gel, jeweils 500 CDU enthaltend, injiziert. Nach 24-stündiger Kultivierung konnten in Sehnen, die mit Kollagenase-Lösung injiziert worden waren, bereits eine in Längsrichtung ausgebreitete Auflösung der Sehnenstruktur wahrgenommen werden (Abb. 5A). In Sehnen, die mit Kollagenase-Gel behandelt worden waren, konnten knopfförmige Auftreibungen beobachtet werden (Abb. 5A). Das Epitenon schien demnach nach der Kollagenase-Gel-Injektion noch weitestgehend intakt zu sein. Nach 48-stündiger Inkubation war die Strukturzerstörung in allen Sehnen weiter vorangeschritten. Sehnen, die mit Kollagenase-Lösung injiziert worden waren, wiesen im Bereich der Injektion eine vollständige Auflösung der Fasern auf, wohingegen die Sehnen, die Kollagenase-Gel erhalten hatten, eine deutliche kolbenförmige Auftreibung mit aufgelockerter Struktur ohne vollständige Auflösung der Fasern zeigten (Abb. 5B).

Um zu prüfen, ob sich durch Kollagenase geschädigtes Gewebe transfizieren lässt, wurden die Sehnen 24 Stunden nach der Kollagenaseapplikation mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  injiziert (50  $\mu\text{g}$  in HBG 5% [0,5mg/ml]). Nach einer weiteren Kultivierungszeit von 24 Stunden konnte im intakten, an den Defekt angrenzenden Gewebe Luciferaseaktivität festgestellt werden (Abb. 5C). Fast vollständig aufgelöstes Gewebe zeigte keine Expression.



**Abb. 5. Defektetablierung ex vivo.** (A, B) Durch Kollagenase-Lösung oder Kollagenase-Gel, jeweils 500 CDU enthaltend, geschädigte explantierte Sehnen nach 24-stündiger (A) bzw. 48-stündiger (B) Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 48 Stunden konnte eine vollständige Faserauflösung im Injektionsbereich in durch Kollagenase-Lösung geschädigten Sehnen und aufgelockertes, aufgetriebenes Gewebe in Sehnen, die Kollagenase-Gel erhalten hatten, festgestellt werden. (C) Biolumineszenz Imaging 24 Stunden nach  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  (50  $\mu\text{g}$  in HBG 5% [0,5 mg/ml]) Injektion und vorheriger Schädigung mit Kollagenase-Gel (500 CDU). Luciferaseaktivität konnte im intakten angrenzenden Gewebe nachgewiesen werden. Fast vollständig aufgelöstes Gewebe wies keine Expression auf.

## **6. *In vivo* Injektion nackter cmRNA in geschädigte und intakte Sehnen von Schafen resultiert in ausgeprägter Proteinexpression**

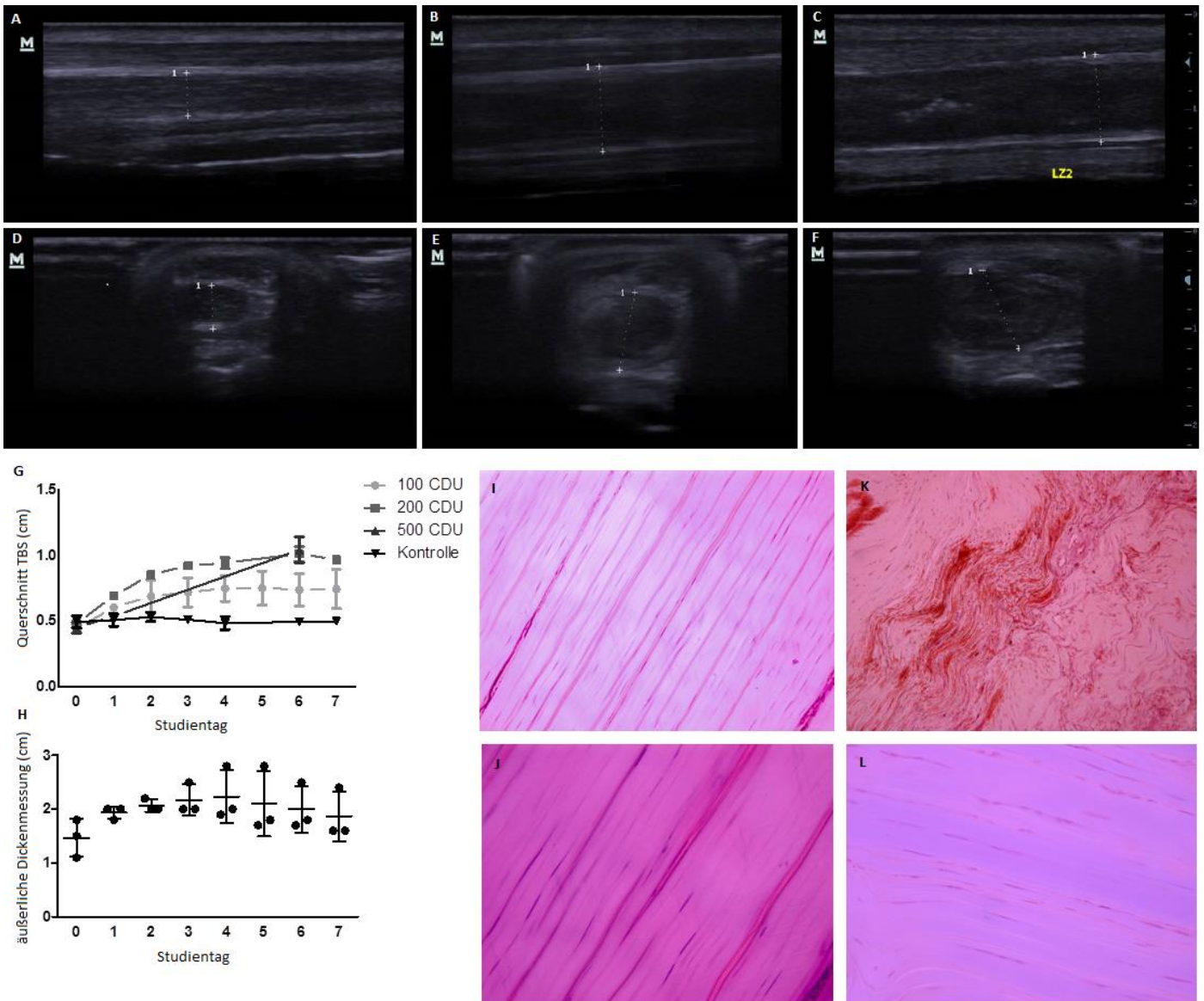
Um zu prüfen, ob cmRNA auch *in vivo* in chemisch geschädigten Sehnen transfektionsfähig bleibt wurde die Kollagenase-Gel Methode im Großtiermodell angewandt. Zu diesem Zweck wurde narkotisierten Schafen Kollagenase-Gel in drei verschiedenen Dosierungen (100 CDU, 200 CDU, 500 CDU; n=3/Gruppe) in die tiefe Beugesehne (TBS) einer Hintergliedmaße injiziert, um einen Defekt mit einer Strukturzerstörung ohne vollständige Ruptur zu erzeugen, der klinisch Vorstadien von Tendinopathien in Menschen und Pferden ähneln sollte. Nachfolgende klinische und ultrasonographische Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (Abb. 6A-F). Die Ultraschalluntersuchung zeigte in allen Gruppen eine zunehmende Inhomogenität der Sehnenstruktur. Der mittlere Durchmesser der TBS, die mit 100 CDU injiziert worden waren, vergrößerte sich innerhalb von 2 Tagen 1,57-fach von  $0,44\text{cm} \pm 0,030\text{cm}$  auf  $0,69\text{cm} \pm 0,126\text{cm}$  und auf  $0,74\text{cm} \pm 0,150\text{cm}$  am Tag 7 (Abb. 5G). Der mittlere Durchmesser der TBS von Schafen, die mit 200 CDU oder 500 CDU behandelt worden waren, vergrößerte sich noch deutlicher und erreichte das Maximum an Tag 6 ( $1,01\text{cm} \pm 0,0566\text{cm}$  bei 200 CDU,  $1,04\text{cm} \pm 0,099\text{cm}$  bei 500 CDU). Durch den Einsatz von Schmerzmedikamenten konnten in der 100 CDU Gruppe lediglich geringgradige Lahmheiten innerhalb der ersten 3 Tage nach der Injektion des Kollagenase-Gels festgestellt werden. Auch wenn das Bein im Bereich der geschädigten Sehne von außen gemessen innerhalb von 4 Tagen im Mittel 1,5-fach von  $1,47\text{cm} \pm 0,351\text{cm}$  auf  $2,23\text{cm} \pm 0,493\text{cm}$  anstieg, dann jedoch allmählich bis Tag 7 wieder auf  $1,87\text{cm} \pm 0,462\text{cm}$  abnahm (Abb. 6H). Schafe, die mit 200 CDU oder 500 CDU behandelt worden waren, litten in den 4 Tagen nach der Kollagenaseinjektion an mittelgradigen Lahmheiten und nachfolgend bis zum Ende der Studie am Tag 7 an geringgradigen Lahmheiten.

Die Sehnenschäden wurden am Tag 7 (Euthanasie der Tiere an diesem Tag) histologisch untersucht, wobei in Sehnen, die mit 100 CDU behandelt worden waren, kleinere nekrotische Areale mit Auflösung der Faserstruktur, Ansammlungen von Erythrozyten und einige wenige Entzündungszellen im zentralen Bereich des Defektes ersichtlich wurden (Abb. 6K). Im peripheren Bereich des Defektes wurden kleinere Ansammlungen von Erythrozyten sowie einzelne Entzündungszellen zwischen den Fasern, die z.T. einen deutlichen wellenförmigen Verlauf aufwiesen, beobachtet. Außerdem erschienen die angrenzenden Fasern geschwollen und die Verbindungen der Fasern gelockert (Abb. 6L). Die Zellzahl und die Zelldichte waren deutlich erhöht (Abb. 6K) im Vergleich zu gesundem Sehnengewebe (Abb. 6I, J). Sehnen, die mit 200 CDU oder 500 CDU behandelt worden waren, wiesen großflächige Nekrosen mit Hämatom und vollständigem Verlust der Faserstruktur auf. Außerdem konnte ein massives Vorkommen von Entzündungszellen beobachtet werden (Abb. A1 im Anhang). Das Ausmaß der nekrotischen Areale belief sich in der 500 CDU Gruppe auf etwa die Hälfte bis ein Drittel der gesamten Sehne, in der 200 CDU Gruppe war ungefähr ein Viertel der Sehne betroffen.

Am Tag 6 (24 Stunden vor der Euthanasie) wurde  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  (500 $\mu\text{g}$  in 100 CDU Gruppe, 400 $\mu\text{g}$  in 200 CDU Gruppe und 200 $\mu\text{g}$  in 500 CDU Gruppe,  $n=2/\text{Gruppe}$ ) in das geschädigte Areal der linken (Abb. 7A, B) sowie in die gesunde rechte TBS der Hintergliedmaßen injiziert. Etwas injizierte Luft, die vorher mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  in der Spritze aufgezogen worden war, machte die Position der applizierten RNA im Ultraschall sichtbar (Abb. 7C). Am folgenden Tag wurden die Schafe euthanasiert und tiefe Beugesehnen wurden für das anschließende *ex vivo* BLI und die histopathologische Untersuchung entnommen. Die Luciferaseaktivität war in geschädigten Regionen der 100 CDU Gruppe intensiver und breiter verteilt (Abb. 7D) als das Signal in den intakten kontralateralen Sehnen (Abb. 7E). Durch 200 und 500 CDU erheblich geschädigte Sehnen wiesen trotz geringeren  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  Mengen lokal deutliche Luciferaseexpression auf (Abb. A2 im Anhang). Die histopathologische

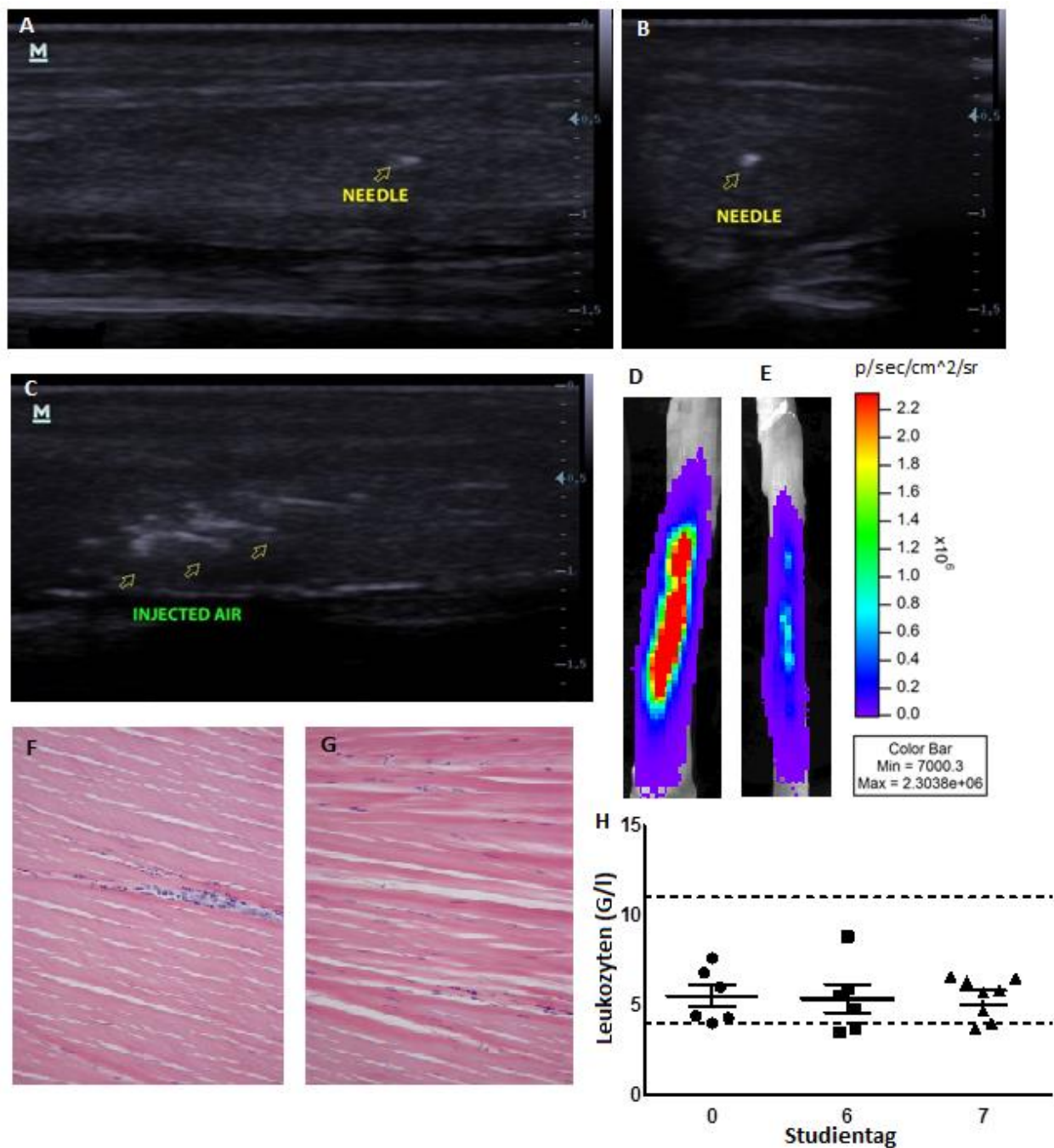
Untersuchung von intakten Sehnen, die zuvor mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  behandelt worden waren, zeigten überwiegend Sehnengewebe ohne pathologische Auffälligkeit. Einzig Ansammlungen von einigen wenigen Makrophagen und Granulozyten konnten im Bereich der Injektionsstelle nachgewiesen werden (Abb. 7F). Gewebe proximal und distal davon wies keinerlei Abnormalität auf (Abb. 7G). Lahmheiten oder Schwellungen wurden nach der Injektion von  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  in intakte Sehnen nicht beobachtet.

Im Hinblick auf Nebenwirkungen muss betont werden, dass die Tiere täglich untersucht wurden. Es wurden keine nachteiligen Auswirkungen durch die Applikation von  $\text{cmRNA}$  ersichtlich. Zusätzlich wurden Blutuntersuchungen vor der  $\text{cmRNA}$  Injektion und 24 Stunden danach durchgeführt. Es konnten keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden. Die gemessenen Leukozytenwerte beispielsweise waren sowohl vor als auch nach der Applikation weitestgehend im physiologischen Bereich (Abb. 7H). Außerdem wurden Leber- und Nierenwerte bestimmt (Tab. A2 im Anhang). Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Applikation von  $\text{cmRNA}$  keine pathologischen Veränderungen ersichtlich wurden.



**Abb. 6. Pathologie von durch Kollagenase-Gel induzierten Sehndefekten im Schaf.** (A-F) Ultraschallaufnahmen im Längs- (A-C) und Querschnitt (D-F) von geschädigter TBS eines Schafes. (A, D) Aufnahmen im Längs- und Querschnitt vor der Kollagenaseinjektion an Tag 0, (B, E) sowie 3 und (C, F) 7 Tage nach der Injektion des Kollagenase-Gels (100 CDU). (G) Analyse des Querschnittes der TBS während der gesamten Studiendauer in Sehnen, die mit 100, 200 oder 500 CDU behandelt wurden, sowie unbehandelten Kontrollsehnen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD. Querschnitte der TBS stiegen im Mittel in allen behandelten Gruppen nach der Applikation von Kollagenase an. (H) Verlauf der äußeren Dickenmessung im Bereich der mit 100 CDU geschädigten TBS während der gesamten Studiendauer. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  SD. Messungen der äußeren Dicke erreichten 4 Tage nach der Kollagenaseinjektion das Maximum (1,5-fach verglichen mit Tag 0). (I-L) H.E. gefärbte Schnitte von intakten (I, J) und geschädigten (K, L) ovinen Sehnen. (I, J) Typische Sehnenstruktur mit zwischen Fasern lokalisierten Tenozyten. (K) Nekrotische Bereiche, Hämatom und deutliche Zerstörung der Faserstruktur im zentralen Bereich des Sehndefektes. Struktur von angrenzenden Fasern war noch weitestgehend erhalten, jedoch erschienen die Fasern geschwollen und Verbindungen zwischen Fasern wirkten gelockert. (L) Zellzahl und Zelldichte im umgebenen Bereich waren erhöht (I, K Vergrößerung  $\times 10$ , J, L Vergrößerung  $\times 20$ ).





**Abb. 7. Erfolgreiche Proteinexpression in intakten und geschädigten Sehnen im Schaf.** (A, B) Ultraschallaufnahmen im Längs- (A) und Querschnitt (B) einer geschädigten TBS an Tag 6 mit Nadel im zentralen Bereich der Sehne. (C) Längsschnitt im Ultraschall kurz nach der  $cmRNA^{LUC}$  Injection. Injizierte Luft ist im zentralen Bereich der Sehne sichtbar. (D, E) BLI von geschädigter (D) und intakter (E) explantierter kontralateraler TBS 24 Stunden nach der *in vivo* Injektion von zwei Depots a  $250\mu g$   $cmRNA^{LUC}$  gelöst in HBG 5% in jede TBS. Schädigung wurde durch die Injektion von 100 CDU hervorgerufen. BLI wurde innerhalb von 2 Stunden *post euthanasia* durchgeführt (F, G) H.E. gefärbte Schnitte im Bereich der Injektionsstelle von intakter  $cmRNA^{LUC}$  behandelter Sehne (F), sowie 3 cm proximal der Injektionsstelle (G). Vergrößerung x20. (H) Leukozytenwerte an Tag 0, Tag 6 und Tag 7. Gestrichelte Linie markiert den Referenzbereich von 4,5-11 G/l.

## IV. DISKUSSION

Kürzlich traten chemisch veränderte messenger RNAs als neue Technologie zur Transfektion verschiedener Gewebe, sowie zur Behandlung unterschiedlicher pathologischer Zustände durch nachfolgend exprimierte therapeutisch wirksame Proteine, in den Focus der Wissenschaft [81, 82]. Da Wachstumsfaktoren während regenerativer Prozesse eine wichtige Rolle spielen sollen, könnte die cmRNA Technologie durch die Expression von physiologisch aktiven Proteinen auch als mögliches Therapeutikum bei Sehnenerkrankungen Verwendung finden. Eine eigens entwickelte *ex vivo* Transfektionsmethode ermöglichte die Untersuchung der Transfektions- bzw Expressionseffizienz von cmRNA in verschiedenen Spezies (Schaf, Rind, Pferd, Schwein und Ratte), sowie die Optimierung von Transfektionsbedingungen und Beurteilung der Expression unterschiedlicher Proteine (Luciferase,  $\beta$ -Galaktosidase und BMP-7). Es konnte dabei festgestellt werden, dass Proteine in allen untersuchten Spezies exprimiert wurden. Erstaunlicherweise war die Expression signifikant höher, wenn nackte cmRNA appliziert wurde, als wenn cmRNA wie üblich mit Lipid- oder Polymer-Carriern komplexiert war. Des Weiteren konnte die transgene Expression durch Mischen der nackten cmRNA mit glukosehaltigen Lösungen maximiert werden. Möglicherweise ist dies durch die nutritive Wirkung zu erklären, da Sehnen durch das geringe Vorkommen von Blutgefäßen relativ schlecht mit Blut bzw. Nährstoffen versorgt werden.

Ergebnisse der *ex vivo* Versuche konnten *in vivo* in intakten Achillessehnen von Ratten bestätigt werden. Die Injektion von cmRNA<sup>LUC</sup> in intakte Achillessehnen resultierte in beachtlicher Luciferaseexpression, welche dosisabhängig nach 24 Stunden den Höchststand erreichte und innerhalb von 7 Tagen wieder abfiel. Diese Beobachtungen ähnelten der schon in *ex vivo* Experimenten beobachteten Expressionskinetik. Die Injektion von potenziell therapeutischer cmRNA<sup>BMP-7</sup> in chirurgisch durchtrennte und anschließend wieder adaptierte Achillessehnen dagegen, ergab ein BMP-7 Expressionsmuster mit ansteigender BMP-7



Expression bis Tag 7 post OP. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* eine gewisse BMP-7 Hintergrundexpression in intakten Rattensehnen nachgewiesen werden konnte, weil der verwendete Antikörper mit endogenem BMP-7 der Ratten kreuzreagierte. Dadurch konnte eine erhöhte Expression von endogenem BMP-7 allein durch den chirurgischen Eingriff beobachtet werden. Eine erhöhte Expression von BMP-7 als Konsequenz von schädigenden Einflüssen auf Sehnen konnte bereits in anderen Tierstudien, sowie in tendinopathischem Sehnenmaterial von betroffenen Patienten nachgewiesen werden [87-91]. Nichtsdestoweniger konnte zu allen Zeitpunkten nach dem chirurgischen Eingriff, verglichen mit Sehnen, welche ausschließlich mit dem Vehikel behandelt worden waren, ein Trend in Richtung einer höheren BMP-7 Expression in  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelten Sehnen erzielt werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Injektion von  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  zu einer erhöhten und möglicherweise verlängerten BMP-7 Expression in geschädigten Sehnen beiträgt.

Neben der Durchführung einer Immunhistochemie zur Expressionsbestimmung von BMP-7 wurde die Methode ebenfalls zur Bestimmung von Kollagen Typ I und III durchgeführt. Der Katabolismus von Kollagen Typ I könnte im Heilungsverlauf einen kritischen Parameter in der inflammatorischen und frühen proliferativen Phase darstellen. Es wird nämlich vermutet, dass ein starker Abbau von Kollagen Typ I mit einer verstärkten Bildung von nicht funktionellem narbenähnlichen Gewebe, anstelle von funktionellem Sehngewebe, einhergehen könnte [92, 93]. Denn im Gegensatz zu Kollagen Typ I wird Kollagen Typ III mit Eigenschaften von vernarbtem Gewebe wie verminderter Zugfestigkeit und Elastizität in Verbindung gebracht [58]. Daher ist ein möglichst geringer Anteil von Typ III Kollagen erstrebenswert. In der vorliegenden Studie wurde in der vehikelbehandelten Gruppe ein Trend hinsichtlich mildem Kollagen Typ I Abbau bis 2 Tage nach dem erfolgten Eingriff beobachtet, wohingegen der Gehalt in  $\text{cmRNA}^{\text{BMP-7}}$  behandelten Sehnen zunächst stabil blieb

und bis Tag 7 etwas anstieg. Die Bestimmung des Kollagen III Gehaltes ergab Tendenzen eines Anstiegs in der Vehikelgruppe von Tag 2 bis Tag 7 post OP, während in Sehnen, welche mit cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelt worden waren, der Anstieg deutlich weniger ausgeprägt war. Desweiteren konnte, verglichen mit der Vehikelgruppe, ein deutlicher Trend eines höheren Kollagen I zu III Verhältnisses ab Tag 2 nach Verabreichung von cmRNA<sup>BMP-7</sup> ermittelt werden. Obwohl in der IHC Auswertung lediglich Trends beobachtet werden konnten, muss bedacht werden, dass auch geringe Unterschiede möglicherweise *in vivo* einen therapeutischen Effekt haben könnten.

Weiterhin ergab die Beurteilung von H.E. gefärbten Sehnenschnitten eine stärkere Zellinfiltration in Sehnenstümpfen der cmRNA<sup>BMP-7</sup> behandelten Gruppe an Tag 1 post OP, wenn auch an den darauf folgenden Tagen keine Unterschiede im Hinblick auf Inflammation und Gewebeproliferation mehr ersichtlich waren. Zusammengefasst kann vermerkt werden, dass cmRNA<sup>BMP-7</sup> möglicherweise durch weniger ausgeprägte Kollagen I Zerstörung, geringeren Kollagen III Aufbau und stärkere zelluläre Infiltration als Folge des Anstiegs von physiologisch aktivem BMP-7 einen positiven Einfluss auf die Sehnenheilung haben könnte. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Ergebnisse der cmRNA<sup>BMP-7</sup> Behandlung sich nur auf die frühe Heilungsphase (1 Woche) von akut geschädigten Achillessehnen beziehen. Es müsste demnach in Langzeitexperimenten geprüft werden, ob die Verabreichung von cmRNA<sup>BMP-7</sup> zu einem frühen Zeitpunkt effektiv genug ist, um auf spätere Phasen der Sehnenheilung Einfluss zu nehmen. Alternativ wäre auch eine wiederholte Applikation denkbar. Die verwendete cmRNA bindet durch die Modifikation von 25% 2-Thiouridin und 25% 5-Methylcytidin kaum an Immunrezeptoren und erzeugt daher nur eine minimale Immunantwort [81]. Es ist demnach nicht mit unerwünschten Immunreaktionen zu rechnen, wie es besonders bei der wiederholten Verabreichung von rekombinanten Proteinen der Fall sein kann. Da Dosis-Wirkungskurven von Zytokinen häufig einen glockenförmigen Verlauf

haben [73], müssten außerdem unterschiedliche Dosen getestet werden. Da dies bedeutet, dass eine höhere Dosis folglich nicht unbedingt auch einen höheren Effekt erzeugen würde.

Die Meinungen, ob BMP-7 die Heilung in der Sehne fördert oder diese im schlechtesten Falle durch die Induktion von heterotoper Ossifikation oder Knorpelbildung sogar hemmt, gehen deutlich auseinander [85, 88, 94, 95]. Diese Studie wurde durchgeführt, um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob die Verwendung von cmRNA überhaupt für geschädigte Sehnen geeignet ist. Um klären zu können, ob BMP-7 tatsächlich einen therapeutischen Effekt besitzt und ob dieser tatsächlich auch durch die Applikation von cmRNA<sup>BMP-7</sup> erzielt werden kann, müssten länger andauernde Studien mit größerer Tierzahl und verschiedenen Verletzungsmodellen durchgeführt werden.

Sehnen können spontan rupturieren, ohne dass Patienten vorher an Symptomen gelitten haben müssen [1, 2]. Man vermutet, dass degenerative Prozesse dafür verantwortlich sind und möglicherweise auch die veränderte Struktur in tendinopathischem Gewebe hervorrufen [96]. Das veränderte Gewebe weist eine Zerstörung von Kollagenfasern mit Auflösung der extrazellulären Matrix, sowie gewöhnlich höchstens milde Entzündungserscheinungen in chronischen Stadien auf [97]. Diese Art von Degeneration könnte unter anderem durch eine hochregulierte Expression von kollagenabbauenden Enzymen, den sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMP) bedingt sein, zumindest konnte dies bereits in chronisch veränderten tendinopathischen Sehnen von Menschen und Tieren nachgewiesen werden [36, 98-100]. Ähnliche MMP Expressionsmuster wurden außerdem in experimentell mit Kollagenase-Gel geschädigten Sehnen in Pferden festgestellt [42]. Da zu vermuten ist, dass Gewebe mit pathologisch veränderter Grundstruktur anders auf äußere Einflüsse reagiert als Gewebe das strukturell prinzipiell intakt ist, sollte hinterfragt werden, ob das häufig verwendete „Achillessehnen-Ruptur-Modell“ mit Tenotomie der gesunden Achillessehne und anschließender Adaptation der Stümpfe in Ratten, welches oftmals Verwendung findet,

tatsächlich zur Untersuchung von Heilungsverläufen geeignet ist. Zumindest mag es vermutlich nicht das optimale Modell sein, um Ergebnisse auf Heilungsprozesse in tendinopathischem Gewebe zu beziehen.

Teilweise werden Patienten in der Human- wie auch der Tiermedizin jedoch in einem Stadium, bevor die Sehne rupturiert, mit Schmerzen oder Beschwerden vorstellig. In Fällen von Überbelastung sollen die Symptome von mikrotraumatischen Faserrissen mit anschließender Entzündung verursacht werden [17]. In Anlehnung an diese Vermutungen wurde ein Defektmodell in Schafen mit zerstörter Faserstruktur entwickelt, jedoch ohne eine vollständige Ruptur herbeizuführen, um möglicherweise den klinischen Charakter von Vorstadien der Tendinopathien zu imitieren. Laut Smith *et al.* sollen Defekte, die durch Kollagenase-Gel induziert worden sind, den natürlich vorkommenden Läsionen ähnlicher sein, als Defekte die durch Injektion mit flüssiger Kollagenase-Lösung entstehen [42]. Die Injektion von Kollagenase-Lösung soll ein höheres Risiko einer Schädigung des Epitenons mit sich bringen, wohingegen das Kollagenase-Gel zentral in der Sehne appliziert werden kann, ohne dass Flüssigkeit zum Epitenon durchdringt [42]. In *ex vivo* Versuchen in explantierten Sehnen, in welchen der Effekt von flüssiger Kollagenase mit dem Effekt von Kollagenase-Gel verglichen wurde, konnte Ähnliches beobachtet werden. Das Kollagenase-Gel verblieb eher am Applikationsort und lies dort das Gewebe aufquellen, wohingegen sich die flüssige Kollagenase longitudinal zwischen den Fasern ausbreitete, die Faserstruktur in diesem Bereich auflöste und bereits nach 24 Stunden das Epitenon geschädigt hatte. Durch diese Erkenntnisse wurde für die Sehnenschädigung im Großtiermodell ebenfalls Kollagenase-Gel verwendet.

Durch die Injektion von 100 CDU in tiefe Beugesehnen konnten Läsionen mit lokal geschädigter Faserstruktur und Einblutungen zwischen den wellenförmig verlaufenden Fasern erzielt werden. Diese Schädigung könnte einem Trauma durch Überbelastung nahe kommen.

Außerdem war die Zellzahl durch eingewanderte Entzündungszellen deutlich erhöht. Die Injektion von 200 CDU oder 500 CDU führte dagegen zu einem erheblichen Sehnenschaden mit großen nekrotischen Arealen, welcher vermutlich natürlicherweise in diesem Ausmaß nicht entstehen würde und somit für experimentelle Untersuchung von Therapieerfolgen eher ungeeignet ist. Es wäre außerdem zu erwarten gewesen, dass solch umfangreiche Schädigung wahrscheinlich bei einem weiteren Bestehen zur vollständigen Ruptur der Sehne geführt hätte.

Um im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung zu klären, ob eine Expression in pathologisch verändertem Sehnengewebe mit geschädigter Feinstruktur *in vivo* möglich ist, wurde  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  in geschädigte Sehnenbereiche der Schafe appliziert. Durch *ex vivo* Experimente, in welchen Luciferase und  $\beta$ -Galaktosidase codierende cmRNA verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des Transgens in intakten Sehnen entlang der Längsachse verteilt. Tatsächlich konnten in Sehnen, welchen zuvor mit 100 CDU injiziert worden waren, vergleichbare Biolumineszenzniveaus mit ähnlichem Verteilungsmuster erreicht werden, wie durch die Transfektion gesunder Sehnen. Die transgene Expression war in verletzten Sehnen sogar etwas intensiver und weiter verteilt als in intakten Sehnen. Diese Beobachtung ist möglicherweise durch eine erhöhte Zellzahl, sowie vermehrte metabolische Aktivität im geschädigten Gewebe zu erklären. Desweiteren wird durch den Kollagenabbau die extrazelluläre Matrix, und damit auch die feste Verbindung zwischen den Sehnenfasern aufgelockert, so dass die cmRNA möglicherweise während der Injektion weiter verteilt werden konnte und somit auch mehr Zellen erreicht hat. Erstaunlicherweise konnte sogar in massiv geschädigten Sehnen mit bis zu 500 CDU noch Luciferaseexpression nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die biologische Verträglichkeit wurden intakte Sehnen 24 Stunden nach der Verabreichung von  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  histopathologisch untersucht. Es zeigte sich einzig eine

geringgradige unspezifische Entzündungsreaktion im Bereich der Injektionsstelle. Es ist denkbar, dass die cmRNA selbst, das exprimierte Protein, oder aber die mechanische Manipulation durch die Nadel oder die Volumenapplikation eine leichte unspezifische Immunantwort ausgelöst haben. Es muss allerdings ausdrücklich betont werden, dass dies zu keiner klinischen Symptomatik geführt hat. Desweiteren wurden verschiedene Blutparameter sowie Leber- und Nierenwerte untersucht, um die pharmakologische Sicherheit von cmRNA nach lokaler Applikation im Großtiermodell zu prüfen. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Injektion von cmRNA in Sehnen der Hintergliedmaße zu keinem ersichtlichen organischen Schaden in Leber oder Nieren geführt hat und es zu keinen maßgeblichen Einwirkungen auf das Immunsystem gekommen ist, da die erfassten Werte 24 Stunden nach cmRNA Applikation zumeist im physiologischen Bereich lagen beziehungsweise davon leicht abweichende Werte schon vor der Applikation differierten. Obwohl zu erwarten ist, dass die RNA nur lokal und zeitlich begrenzt am Applikationsort verbleibt und systemisch keinen Einfluss nimmt, so sollte die Verträglichkeit dennoch auch über einen längeren Zeitraum geprüft werden. Um das therapeutische Potenzial von cmRNAs auch in chemisch geschädigten Sehnen zu beurteilen, wäre die Applikation von wachstumsfaktorcodierender cmRNA in diesem Defektmodell mit unvollständiger Ruptur denkbar.

Die Ergebnisse geben den Anstoß, dass cmRNAs durch die Expression therapeutischer Proteine das Potenzial zur Behandlung verletzter Sehnen besitzen, auch wenn in dieser Studie nur kurzzeitige Effekte von cmRNA in frühen Heilungsphasen untersucht worden sind. Weitere Studien werden daher notwendig sein, um längerfristige Auswirkungen von cmRNA auf die Sehnenheilung und den Gesamtorganismus abzuklären und um zu differenzieren ob cmRNA auch Effekte auf fortgeschrittene bzw chronische Sehnenerkrankungen haben kann. Des Weiteren müsste abgewogen werden, ob nicht vielleicht ein anderer Wachstumsfaktor für die Behandlung von Sehnenverletzungen besser geeignet sein könnten. Denn tatsächlich gibt

es eine Vielzahl von potenziellen therapeutischen Targets, welche als interessante Kandidaten für die Behandlung von Sehnenverletzungen in Betracht gezogen werden könnten, wie z.B. BMP-12, PDGFb, VEGF oder IGF. Denkbar wäre möglicherweise auch eine cmRNA, die für Komponenten der extrazellulären Matrix kodiert, wie beispielsweise Kollagen Typ I. Vielleicht wird auch erst eine Kombination aus verschiedenen Faktoren die größte Wirkung erzielen können.

### **Fazit**

Die Injektion von nackten cmRNAs in intakte oder geschädigte Sehnen führt zuverlässig zu einer ausgeprägten lokalen Expression von biologisch aktiven Proteinen. Die lokale Applikation von nackter cmRNA in Sehnen scheint außerdem *in vivo* gut verträglich zu sein. Es ist demnach denkbar, dass cmRNA, die für jedes beliebige therapeutisch wirkende Protein kodieren könnte, zur Behandlung von Sehnenerkrankungen Verwendung finden könnte.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Sehnenerkrankungen treten sowohl in der Human- sowie der Tiermedizin häufig auf. Therapeutische Maßnahmen bleiben jedoch wegen hoher Rezidivraten oft unbefriedigend. Die Anwendung von nackter chemisch modifizierter Messenger RNA (cmRNA), die für therapeutische Proteine kodiert, könnte einen innovativen Ansatz für die Behandlung von Sehnenerkrankungen darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von nackter in Glukoselösung gelöster cmRNA in intakten sowie experimentell geschädigten Sehnen, zu einer starken Proteinexpression im Sehngewebe führt. Die Injektion von für BMP-7 kodierende cmRNA führte in tenotomierten Achillessehnen von Ratten tendenziell zu einer höheren BMP-7 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem konnten Trends in Richtung eines etwas geringeren Abbaus von Kollagen Typ I, verminderter Bildung von Kollagen Typ III, eines höheren Verhältnisses von Kollagen I zu III und eine stärkere Zellinfiltration in Sehnenstümpfen beobachtet werden. Des Weiteren wurde cmRNA, die für das Reporterprotein Luciferase kodierte, in einem Tendinitismodell in Schafen in Sehnendefekte injiziert, wodurch eine ausgeprägte Expression im geschädigten Gewebe erzielt werden konnte. Die Ergebnisse legen nahe, dass cmRNAs, die für therapeutische Proteine kodieren, das Potenzial besitzen könnten als neue „Medikamentenklasse“ zur Behandlung von Sehnenerkrankungen Anwendung zu finden.



## **VI. SUMMARY**

Tendon disorders are quite frequent both in human and veterinary medicine. Current therapeutic treatments often remain unsatisfied due to high re-injury rates. Application of naked chemically modified mRNA (cmRNA) encoding for a therapeutic protein, presents itself as an innovative approach addressing tendon healing. It has been demonstrated in the current study that injection of naked cmRNA dissolved in glucose containing solution into tendons results in high protein expression in intact and experimentally injured tendons. Injection of BMP-7 encoding cmRNA in tenotomized rat Achilles tendons resulted in higher expression of BMP-7 protein by trend and tendencies of less fulminant degradation of collagen type I, decreased collagen type III formation as well as higher collagen I/III ratio and chemotactic cell attraction in surgically dissected tendons compared to vehicle treatment. Moreover reporter protein encoding cmRNA was injected into acute tendon injuries in a sheep tendonitis model, revealing wide spread and profound tissue transfection in pathologically affected tissue. Summarizing, these results suggest that cmRNAs encoding for therapeutic proteins have the potential as a new “class of drugs” for the treatment of tendon disorders.

## VII. LITERATUR

- [1] Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes. *Sports medicine* (Auckland, NZ). 1994;18:173-201.
- [2] Jozsa LG, Kannus P. *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign, Illinois: Human Kinetics; 1997.
- [3] Paavola M, Kannus P, Jarvinen TA, Khan K, Jozsa L, Jarvinen M. Achilles tendinopathy. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84-a:2062-76.
- [4] de Jonge S, van den Berg C, de Vos RJ, van der Heide HJ, Weir A, Verhaar JA, et al. Incidence of midportion Achilles tendinopathy in the general population. *British journal of sports medicine*. 2011;45:1026-8.
- [5] Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot and ankle clinics*. 2005;10:255-66.
- [6] Herrmann SJ, Izadpanah K, Sudkamp NP, Strohm PC. Tears of the Rotator Cuff. Causes - Diagnosis - Treatment. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2014;81:256-66.
- [7] Lantto I, Heikkinen J, Flinkkila T, Ohtonen P, Leppilahti J. Epidemiology of Achilles tendon ruptures: Increasing incidence over a 33-year period. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2014.
- [8] Thorpe CT, Clegg PD, Birch HL. A review of tendon injury: why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine veterinary journal*. 2010;42:174-80.
- [9] Kasashima Y, Takahashi T, Smith RK, Goodship AE, Kuwano A, Ueno T, et al. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine veterinary journal*. 2004;36:346-50.
- [10] Pinchbeck GL, Clegg PD, Proudman CJ, Stirk A, Morgan KL, French NP. Horse injuries and racing practices in National Hunt racehorses in the UK: the results of a prospective cohort study. *Veterinary journal* (London, England : 1997). 2004;167:45-52.
- [11] Takahashi T, Kasashima Y, Ueno Y. Association between race history and risk of superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2004;225:90-3.
- [12] Ely ER, Avella CS, Price JS, Smith RK, Wood JL, Verheyen KL. Descriptive epidemiology of fracture, tendon and suspensory ligament injuries in National Hunt racehorses in training. *Equine veterinary journal*. 2009;41:372-8.
- [13] Clegg PD. Musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 2: Tendon and ligament injuries. *Equine veterinary journal*. 2012;44:371-5.
- [14] Lam KH, Parkin TD, Riggs CM, Morgan KL. Descriptive analysis of retirement of Thoroughbred racehorses due to tendon injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004). *Equine veterinary journal*. 2007;39:143-8.
- [15] Lam K, Parkin T, Riggs C, Morgan K. Use of free text clinical records in identifying syndromes and analysing health data. *The Veterinary record*. 2007;161:547-51.
- [16] Johnson JM, Johnson AL. Cranial cruciate ligament rupture. Pathogenesis, diagnosis, and postoperative rehabilitation. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 1993;23:717-33.
- [17] Kannus P. Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1997;7:78-85.
- [18] James SL, Bates BT, Osternig LR. Injuries to runners. *The American journal of sports medicine*. 1978;6:40-50.
- [19] Schepsis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *The American journal of sports medicine*. 2002;30:287-305.
- [20] Muto T, Kokubu T, Mifune Y, Inui A, Harada Y, Yoshifumi, et al. Temporary inductions of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression and cell apoptosis are associated with tendon degeneration or rupture after corticosteroid injection. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2014;32:1297-304.

- [21] Kawtharani F, Masrouha KZ, Afeiche N. Bilateral Achilles Tendon Ruptures Associated with Ciprofloxacin Use in the Setting of Minimal Change Disease: Case Report and Review of the Literature. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. 2014.
- [22] Shimatsu K, Subramaniam S, Sim H, Aronowitz P. Ciprofloxacin-induced tendinopathy of the gluteal tendons. *Journal of general internal medicine*. 2014;29:1559-62.
- [23] Patterson-Kane JC, Rich T. Achilles tendon injuries in elite athletes: lessons in pathophysiology from their equine counterparts. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2014;55:86-99.
- [24] Ippolito E, Postacchini F, Ricciardi-Pollini PT. Biochemical variations in the matrix of human tendons in relation to age and pathological conditions. *Italian journal of orthopaedics and traumatology*. 1975;1:133-9.
- [25] Magnan B, Bondi M, Pierantoni S, Samaila E. The pathogenesis of Achilles tendinopathy: A systematic review. *Foot and ankle surgery : official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons*. 2014;20:154-9.
- [26] Smith R, McIlwraith W, Schweitzer R, Kadler K, Cook J, Caterson B, et al. Advances in the understanding of tendinopathies: A report on the Second Havemeyer Workshop on equine tendon disease. *Equine veterinary journal*. 2014;46:4-9.
- [27] Gaida JE, Cook JL, Bass SL. Adiposity and tendinopathy. *Disability and rehabilitation*. 2008;30:1555-62.
- [28] Perkins NR, Reid SW, Morris RS. Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*. 2005;53:184-92.
- [29] Raikin SM, Garras DN, Krapchev PV. Achilles tendon injuries in a United States population. *Foot & ankle international*. 2013;34:475-80.
- [30] Huttunen TT, Kannus P, Rolf C, Fellander-Tsai L, Mattila VM. Acute achilles tendon ruptures: incidence of injury and surgery in Sweden between 2001 and 2012. *The American journal of sports medicine*. 2014;42:2419-23.
- [31] Baird AE, Carter SD, Innes JF, Ollier WE, Short AD. Genetic basis of cranial cruciate ligament rupture (CCLR) in dogs. *Connective tissue research*. 2014;55:275-81.
- [32] Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2006;6:181-90.
- [33] James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *The Journal of hand surgery*. 2008;33:102-12.
- [34] Jarvinen M, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Leadbetter W. Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1997;7:86-95.
- [35] Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. *Clinics in sports medicine*. 1992;11:533-78.
- [36] Muir P, Danova NA, Argyle DJ, Manley PA, Hao Z. Collagenolytic protease expression in cranial cruciate ligament and stifle synovial fluid in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Veterinary Surgery*. 2005;34:482-90.
- [37] Fu SC, Chan BP, Wang W, Pau HM, Chan KM, Rolf CG. Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2002;73:658-62.
- [38] Wilson AM, Goodship AE. Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. *Journal of biomechanics*. 1994;27:899-905.
- [39] Birch HL, Wilson AM, Goodship AE. The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *The Journal of experimental biology*. 1997;200:1703-8.
- [40] Archambault JM, Wiley JP, Bray RC. Exercise loading of tendons and the development of overuse injuries. A review of current literature. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1995;20:77-89.
- [41] Rees JD, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *The American journal of sports medicine*. 2009;37:1855-67.

- [42] Watts AE, Nixon AJ, Yeager AE, Mohammed HO. A collagenase gel/physical defect model for controlled induction of superficial digital flexor tendonitis. *Equine veterinary journal*. 2012;44:576-86.
- [43] Williams JG. Achilles tendon lesions in sport. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1986;3:114-35.
- [44] Bray RC, Rangayyan RM, Frank CB. Normal and healing ligament vascularity: a quantitative histological assessment in the adult rabbit medial collateral ligament. *Journal of anatomy*. 1996;188 (Pt 1):87-95.
- [45] Liu CF, Aschbacher-Smith L, Barthelery NJ, Dymment N, Butler D, Wylie C. What we should know before using tissue engineering techniques to repair injured tendons: a developmental biology perspective. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2011;17:165-76.
- [46] Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, Tcheng TK, Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1978;44:542-6.
- [47] Mast BA. Healing in other tissues. *The Surgical clinics of North America*. 1997;77:529-47.
- [48] Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2003;33:381-94.
- [49] Gelberman RH, Manske PR, Vande Berg JS, Lesker PA, Akeson WH. Flexor tendon repair in vitro: a comparative histologic study of the rabbit, chicken, dog, and monkey. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1984;2:39-48.
- [50] Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *The Journal of hand surgery*. 1998;23:1052-8.
- [51] Garner WL, McDonald JA, Koo M, Kuhn C, 3rd, Weeks PM. Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. *Plastic and reconstructive surgery*. 1989;83:875-9.
- [52] Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87:187-202.
- [53] Williams IF, Heaton A, McCullagh KG. Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Research in veterinary science*. 1980;28:302-10.
- [54] Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20:1352-7.
- [55] Dahlgren LA, Brower-Toland BD, Nixon AJ. Cloning and expression of type III collagen in normal and injured tendons of horses. *American journal of veterinary research*. 2005;66:266-70.
- [56] Oliva F, Via AG, Maffulli N. Role of growth factors in rotator cuff healing. *Sports medicine and arthroscopy review*. 2011;19:218-26.
- [57] O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1997;7:55-61.
- [58] Sharma P, Maffulli N. The future: rehabilitation, gene therapy, optimization of healing. *Foot and ankle clinics*. 2005;10:383-97.
- [59] Hogan MV, Bagayoko N, James R, Starnes T, Katz A, Chhabra AB. Tissue engineering solutions for tendon repair. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2011;19:134-42.
- [60] Bosch G, Lin YL, van Schie HT, van De Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. Effect of extracorporeal shock wave therapy on the biochemical composition and metabolic activity of tenocytes in normal tendinous structures in ponies. *Equine veterinary journal*. 2007;39:226-31.
- [61] Seeliger C, Falldorf K, Sachtleben J, van Griensven M. Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts. *European journal of medical research*. 2014;19:37.
- [62] Hart L. Corticosteroid and other injections in the management of tendinopathies: a review. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2011;21:540-1.

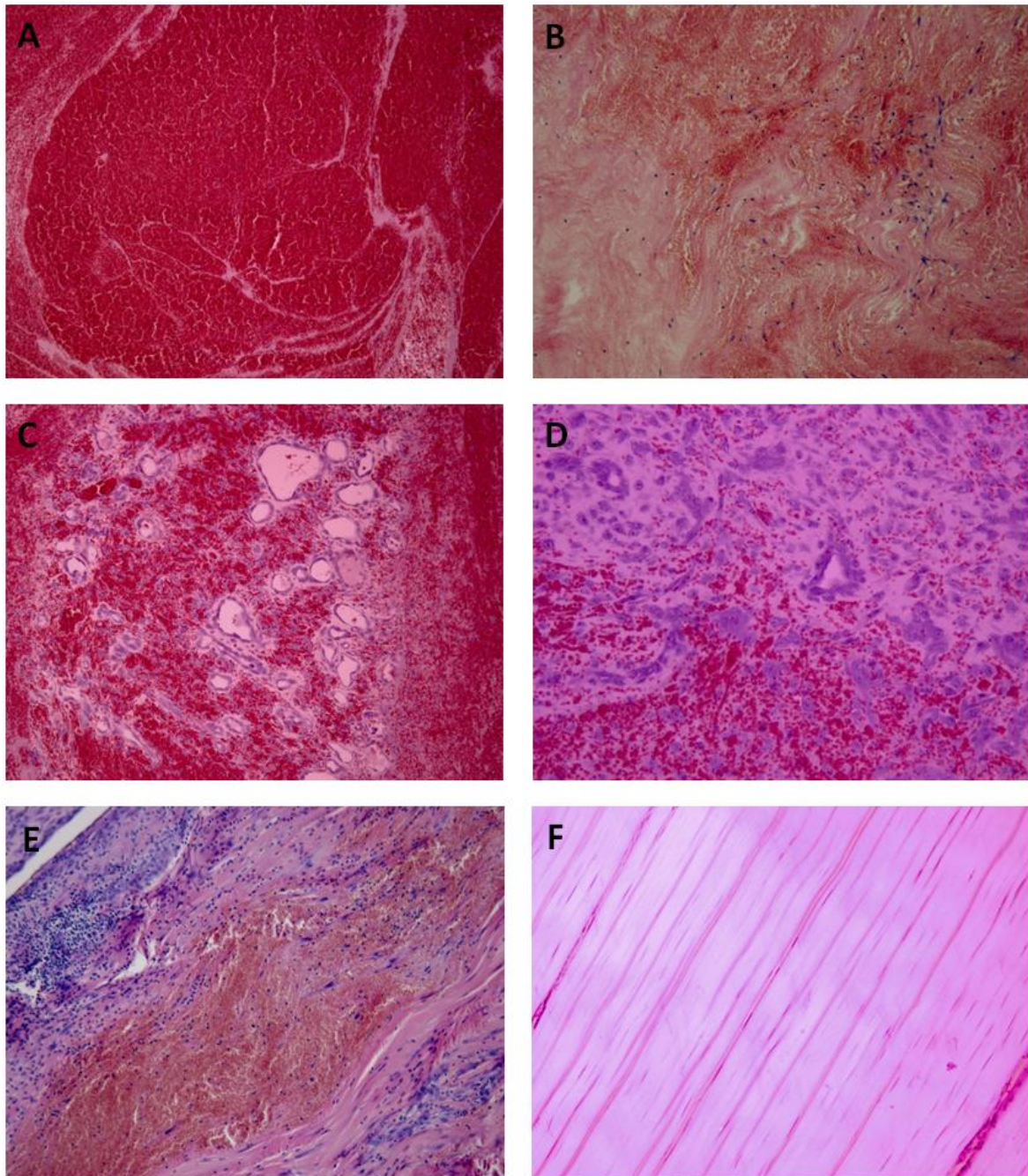
- [63] Muneta T, Koga H, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Hyaluronan injection therapy for athletic patients with patellar tendinopathy. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2012;17:425-31.
- [64] Foland JW, Trotter GW, Powers BE, Wrigley RH, Smith FW. Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *American journal of veterinary research*. 1992;53:2371-6.
- [65] Moraes JR, Facco GG, Moraes FR, Engracia Filho JR, Miyazato LG, Beretta DC. Effects of glycosaminoglycan polysulphate on the organisation of collagen fibres in experimentally induced tendonitis in horses. *The Veterinary record*. 2009;165:203-5.
- [66] Smith RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disability and rehabilitation*. 2008;30:1752-8.
- [67] Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, Testoni S, De Benedictis GM, Negro A, et al. Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2013;31:306-14.
- [68] Renzi S, Ricco S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Research in veterinary science*. 2013;95:272-7.
- [69] Witte TH, Yeager AE, Nixon AJ. Intralesional injection of insulin-like growth factor-I for treatment of superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred racehorses: 40 cases (2000-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2011;239:992-7.
- [70] Shah V, Bendele A, Dines JS, Kestler HK, Hollinger JO, Chahine NO, et al. Dose-response effect of an intra-tendon application of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in a rat Achilles tendinopathy model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2013;31:413-20.
- [71] Arguelles D, Carmona JU, Climent F, Munoz E, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *The Veterinary record*. 2008;162:208-11.
- [72] de Vos RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JA, Weinans H, van Schie HT. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *British journal of sports medicine*. 2011;45:387-92.
- [73] Evans CH. Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1999;28:71-6.
- [74] Grotendorst GR. Growth factors as regulators of wound repair. *International journal of tissue reactions*. 1988;10:337-44.
- [75] Majewski M, Betz O, Ochsner PE, Liu F, Porter RM, Evans CH. Ex vivo adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model. *Gene therapy*. 2008;15:1139-46.
- [76] Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, et al. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28:211-7.
- [77] Nakamura N, Shino K, Natsuume T, Horibe S, Matsumoto N, Kaneda Y, et al. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene therapy*. 1998;5:1165-70.
- [78] Evans C. Using genes to facilitate the endogenous repair and regeneration of orthopaedic tissues. *International orthopaedics*. 2014.
- [79] Lou J, Tu Y, Burns M, Silva MJ, Manske P. BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2001;19:1199-202.
- [80] Tong H, Qin S, Fernandes JC, Li L, Dai K, Zhang X. Progress and prospects of chitosan and its derivatives as non-viral gene vectors in gene therapy. *Current gene therapy*. 2009;9:495-502.

- [81] Kormann MS, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nature biotechnology*. 2011;29:154-7.
- [82] Zangi L, Lui KO, von Gise A, Ma Q, Ebina W, Ptaszek LM, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature biotechnology*. 2013;31:898-907.
- [83] Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C. Current prospects for mRNA gene delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2009;71:484-9.
- [84] Dai Q, Manfield L, Wang Y, Murrell GA. Adenovirus-mediated gene transfer to healing tendon--enhanced efficiency using a gelatin sponge. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21:604-9.
- [85] Yeh LC, Tsai AD, Lee JC. Bone morphogenetic protein-7 regulates differentially the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in rat achilles and patellar tendon cell cultures. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104:2107-22.
- [86] Pauly S, Klatte F, Strobel C, Schmidmaier G, Greiner S, Scheibel M, et al. BMP-2 and BMP-7 affect human rotator cuff tendon cells in vitro. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons [et al]*. 2012;21:464-73.
- [87] Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P. Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin? *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466:1592-7.
- [88] Yee Lui PP, Wong YM, Rui YF, Lee YW, Chan LS, Chan KM. Expression of chondro-osteogenic BMPs in ossified failed tendon healing model of tendinopathy. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29:816-21.
- [89] Rui YF, Lui PP, Rolf CG, Wong YM, Lee YW, Chan KM. Expression of chondro-osteogenic BMPs in clinical samples of patellar tendinopathy. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2012;20:1409-17.
- [90] Yu Y, Bliss JP, Bruce WJ, Walsh WR. Bone morphogenetic proteins and Smad expression in ovine tendon-bone healing. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2007;23:205-10.
- [91] Lui PP, Wong Y. Higher BMP/Smad sensitivity of tendon-derived stem cells (TDSCs) isolated from the collagenase-induced tendon injury model: possible mechanism for their altered fate in vitro. *BMC musculoskeletal disorders*. 2013;14:248.
- [92] Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. 2005;3:309-16.
- [93] Loisel AE, Frisch BJ, Wolenski M, Jacobson JA, Calvi LM, Schwarz EM, et al. Bone marrow-derived matrix metalloproteinase-9 is associated with fibrous adhesion formation after murine flexor tendon injury. *PloS one*. 2012;7:e40602.
- [94] Forslund C, Aspenberg P. OP-1 has more effect than mechanical signals in the control of tissue differentiation in healing rat tendons. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1998;69:622-6.
- [95] Lui PP. Histopathological changes in tendinopathy--potential roles of BMPs? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2013;52:2116-26.
- [96] Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21:185-95.
- [97] Pecina M, Bojanic I, Ivkovic A, Brcic L, Smoljanovic T, Seiwerth S. Patellar tendinopathy: histopathological examination and follow-up of surgical treatment. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2010;77:277-83.
- [98] Castagna A, Cesari E, Garofalo R, Gigante A, Conti M, Markopoulos N, et al. Matrix metalloproteases and their inhibitors are altered in torn rotator cuff tendons, but also in the macroscopically and histologically intact portion of those tendons. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2013;3:132-8.

- [99] Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, et al. Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54:832-42.
- [100] Nomura M, Hosaka Y, Kasashima Y, Ueda H, Takehana K, Kuwano A, et al. Active Expression of Matrix Metalloproteinase-13 mRNA in the Granulation Tissue of Equine Superficial Digital Flexor Tendinitis. *J Vet Med Sci*. 2007;69:637-9

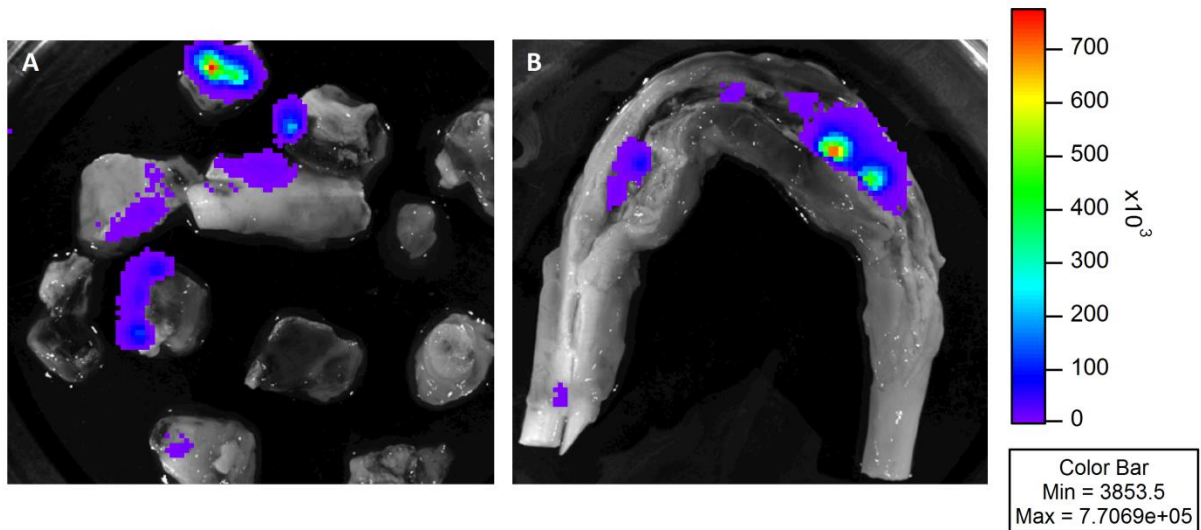


## VIII. ANHANG



**Abb. A1. Histopathologische Charakterisierung der Sehndefekte 7 Tage nach Kollagenase-Gel Applikation mit 200 oder 500 CDU (H.E. Färbung). (A)** Ausgeprägtes Hämatom im zentralen Bereich des Defekts. **(B)** Nekrotisches Material, Ansammlungen von Erythrozyten sowie eingewanderte Entzündungszellen im peripheren Bereich des Defekts. **(C)** Neovaskularisation und **(D)** Einwanderung von Entzündungszellen im peripheren Bereich des Hämatoms. **(E)** Ansammlungen von Erythrozyten zwischen den Fasern und massive Entzündung im peripheren Bereich des Defekts. **(F)** Intakte TBS der kontralateralen Gliedmaße. Tenozyten sind zwischen parallel angeordneten Fasern lokalisiert. (A-C, E, F Vergrößerung x10, D Vergrößerung x20).





**Abb. A2. Luciferaseaktivität in erheblich geschädigten Sehnen.** (A) Sehne wurde *in vivo* durch die Injektion von 500 CDU geschädigt und sechs Tage später (24h vor der Euthanasie) mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  (zwei Depots a 100 $\mu\text{g}$  in HBG 5% [1mg/ml]) injiziert. Wegen der ausgeprägten Schädigung wurde Sehne zur Inkubation in Luciferinlösung in Stücke geschnitten. (B) Sehne wurde *in vivo* durch die Injektion von 200 CDU geschädigt und 24h vor der Euthanasie mit  $\text{cmRNA}^{\text{LUC}}$  (zwei Depots a 200 $\mu\text{g}$  in HBG 5% [1mg/ml]) injiziert. Sehne wurde vor der Inkubation in Luciferinlösung in Längsrichtung aufgeschnitten.

Tab. A2. Ausgewählte Blutparameter und Analyse von Leber- und Nierenwerten.

Applizierte cmRNA		400µg			800µg			1000µg		
		d 0	d 6	d 7	d 0	d 6	d 7	d 0	d 6	d 7
Blutparameter	Leukozyten [G/l] <sup>1</sup>	7.4 ±2.0	6.2 ±0.6	7.6*	6.8*	5.2 ±0.5	6.1 ±0.6	4.2 ±0.2	3.6 ±0.1	4.2 ±0.7
	Hämatokrit [%] <sup>2</sup>	48.3 ±3.3	51,7 ±4.2	43,9*	41.5 ±0.7	35.5 ±2.1	40.0 ±1.4	29.5 ±6.4	29.0 ±4.2	36.0± 0.0
	Thrombozyten [G/L] <sup>3</sup>	409*	500 ±87	461*	450 ±152	554 ± 192	562 ±172	521 ±52	421 ±25	564 ±43
Niere	Harnstoff-N [mg/dl] <sup>4</sup>	21*	11 ±0.0	7.5 ±0.7	17 ±4.2	13.5 ±3.5	6 ±0.7	14 ±1.4	12 ±2.8	7.5 ±2.1
	Kreatinin [mg/dl] <sup>5</sup>	1.1*	1.0 ±0.0	1.1 ±0.1	1.1 ±0.1	1.2 ±0.3	1.1 ±0.0	0.8 ±0.1	0.7 ±0.0	0.7 ±0.1
Leber	Alkalische Phosphatase (AP) [U/l] <sup>6</sup>	79*	61 ±5	49 ±9	102 ±38	88 ±34	89 ±47	69 ±21	74 ±36	89 ±63
	Aspartatamino-transferase(AST)[U/l] <sup>7</sup>	109*	161 ±23	152 ±21	99 ±21	177 ±55	139 ±10	81 ±6	78 ± 13	92 ± 35
	γ-Glutamyltrans-ferase (γ-GT) [U/l] <sup>8</sup>	75*	68 ±5.7	61 ±5.7	73 ±11	78 ±21	65 ±1	63 ±6.4	59 ±4.2	57 ±3.5
	Glutamat-dehydrogenase (GLDH) [U/l] <sup>9</sup>	3*	4.5 ±2.1	7 ±4.2	6 ±1.4	3.5 ±0.7	3 ±0.0	6.5 ±0.7	6.5 ±3.5	6.5 ±3.5
	Gallensäuren [µmol/l] <sup>10</sup>	4.3*	8.6 ±10.5	12.4 ±6.9	12 ±9.5	2.7 ±1.8	10.4 ±7.6	4.5 ±3.5	4.6 ±4.2	26.6 ±26.4
	Gesamtbilirubin [mg/dl] <sup>11</sup>	0.3*	0.3 ±0.1	0.4 ±0.0	0.2 ±0.0	0.35 ±0.1	0.2 ±0.0	0.3 ±0.1	0.25 ±0.1	0.2 ±0.0
	Albumin im Serum [g/dl] <sup>12</sup>	3.8*	3.7 ±0.4	3.5 ±0.2	3.7 ±0.5	3.8 ±0.8	3.2 ±0.1	3.1 ±0.3	2.9 ±0.3	2.9 ±0.2

Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt (n=2, \*n=1). Referenzwerte: <sup>1</sup> 4,5-11 G/l, <sup>2</sup> 27-40%, <sup>3</sup> 280-650 G/l, <sup>4</sup> 5-11 mg/dl, <sup>5</sup> < 1.9mg/dl, <sup>6,7</sup> < 180 U/l, <sup>8</sup> < 32 U/l, <sup>9</sup> <9 U/l, <sup>10</sup> postprandial < 40 µmol/l, <sup>11</sup> < 0.4 mg/dl, <sup>12</sup> 2-3 g/dl.

**IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

bFGF	Basic fibroblast growth factor
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
BMP-7	Bone morphogenetic protein 7
BMP-12	Bone morphogenetic protein 12
CDU	Collagen digestion unit
cmRNA	chemisch modifizierte messenger RNA
HBG	Hepes buffered glucose
IGF	Insulin-like growth factor
LUC	Luciferase
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	isotonische Kochsalzlösung
NaCl+5% Gluc	5% Glukose enthaltende isotonische Kochsalzlösung
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PDGFb	Platelet derived growth factor b
brPEI	verzweigtes Polyethylenimin
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
TBS	Tiefe Beugesehne
OBS	Oberflächliche Beugesehne
OP	Operation
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w/t	Wildtyp

## **X. DANKSAGUNG**

Großer Dank gilt Prof. Dr. Christian Plank und Dr. Carsten Rudolph, die mir die Anfertigung meiner Dissertation in einem professionellen Umfeld ermöglichten. Durch ihr detailliertes Fachwissen und die kontinuierliche Unterstützung konnte diese wissenschaftliche Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden.

Besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Dr. Günther Hasenpusch, der mir bei inhaltlichen und methodischen Fragen sowie der Umsetzung mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne seine wertvollen Ideen wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ebenso möchte ich insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Hermann Ammer für die zielführende Unterstützung und Begutachtung meiner Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich meinen wissenschaftlichen Kollegen, im Speziellen Dr. Dr. Thomas Brill, Dr. Manish Aneja, Dr. Martin Schweizer und Dr. Johannes Geiger, für die anregenden Diskussionen und wertvolle Hilfe bei der Umsetzung meiner Experimente danken.